Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

56. BAND, 3. HEFT
MIT 92 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 7. FEBRUAR 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Planta (Berl.)

Preis DM 27.60

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität,

oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 83 03 01, Fernschreibnummer 01-83 319
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 2 79 01, Fernschreibnummer 04-61 723

56. Band — **Inhaltsverzeichnis** — 3. Heft

Seite

Drawert, H., und M. Mix, Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. II. Mitteilung: Hüllgallerte und Schleimbildung bei *Microsterias*, *Pleurotaenium* und *Hyalotheca*. Mit 42 Textabbildungen 237

Weichart, G., Untersuchungen über Phosphorylierungsprozesse bei der Photosynthese höherer Pflanzen *(Helodea)* unter Verwendung von radioaktivem Phosphat. Mit 15 Textabbildungen 262

Klingmüller, W., Die Schädigung von *Vicia faba*-Samen durch Trocknung — ein umkehrbarer Effekt. Mit 8 Textabbildungen 290

Eberhard, D., W. Rau und C. Zehender, Über den Einfluß des Lichts auf die Carotinoidbildung von *Fusarium aquaeductuum*. Mit 4 Textabbildungen 302

Klämbt, H.-D., Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. Reaktionsprodukte der IES in Abhängigkeit von den Inkubationskonzentrationen. Mit 3 Textabbildungen 309

Schneider, G., Biochemische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen zur Frage des Schossens und der Blütenbildung der Zuckerrübe. II. Mitteilung: Quantitative Veränderungen des Eiweiß-, Aminosäuren- und Zuckergehaltes während des Überganges in die reproduktive Entwicklung. Mit 10 Textabbildungen 322

Schwemmle, J., Keimversuche auf genetischer Grundlage. IV. Prädetermination der Lichtbedürftigkeit der Samen und des Keimverlaufes. Mit 10 Textabbildungen . . 348

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta 56, 237—261 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DESMIDIACEEN

II. Mitteilung

HÜLLGALLERTE UND SCHLEIMBILDUNG BEI *MICRASTERIAS*, *PLEUROTAENIUM* UND *HYALOTHECA*

Von

HORST DRAWERT und MARIANNE MIX

Mit 42 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Oktober 1960)

1. Einleitung

In den Zellwänden von *Micrasterias*, *Cosmarium*, *Closterium* und *Hyalotheca* ließen sich elektronenmikroskopisch Poren mit einem Durchmesser von 130—200 mμ nachweisen (LHOTSKÝ 1949, DRAWERT u. METZNER-KÜSTER 1961). Ferner konnten für *Micrasterias papillifera*, *Cosmarium Lundelii* (CHARDARD u. ROUILLER 1957) und *Hyalotheca dissiliens* (DRAWERT u. METZNER-KÜSTER 1961) die sogenannten „Porenapparate" (SCHRÖDER 1902, LÜTKEMÜLLER 1902) und für *Hyalotheca* auch der Aufbau der Hüllgallerte aus einzelnen „Gallertprismen" (KLEBS 1886, HAUPTFLEISCH 1888, LÜTKEMÜLLER 1902) elektronenmikroskopisch bestätigt werden. CHARDARD u. ROUILLER (1957) haben allerdings für die von ihnen untersuchten Arten die Hüllgallerte nicht nachweisen können (vgl. dazu aber S. 252).

Bei den Desmidiaceen muß man ihrer Funktion nach verschiedene Gallerttypen unterscheiden (KRIEGER 1937). Die Zellen der koloniebildenden Formen werden durch Verbindungsgallerte zusammengehalten. Einige seßhafte Arten heften sich mit Befestigungsgallerte einer Unterlage an. Weit verbreitet ist die bereits oben erwähnte Hüllgallerte, die eine geschlossene Kapsel um die Einzelzelle oder auch um eine Zellkolonie, z. B. bei *Hyalotheca*, bildet. Der Ortsbewegung dient die Bewegungsgallerte. Uns soll zunächst nur die Hüllgallerte beschäftigen.

Über die Funktion der Poren und Porenapparate bei der Gallertausscheidung ist man sich noch völlig im unklaren. KLEBS (1885) denkt an Körnchen, die immer von neuem vom Cytoplasma durch die Wand ausgeschieden werden, und durch deren allmähliche Verquellung die Gallerthülle entsteht. Nach der Vorstellung von LÜTKEMÜLLER (1902) durchsetzen die Porenapparate die Zellwand mit „Porenfäden", die an der Innengrenze der Zellwand mit einer linsenförmigen Anschwellung, der „Porenzwiebel", beginnen und an der äußeren Zellwandfläche mit einer knopfförmigen oder auch anders gestalteten Erweiterung, dem „Endknöpfchen", enden. Verschiedene Umstände „weisen darauf hin,

daß die Gallertprismen den Endanschwellungen der Porenorgane ihre Entstehung verdanken; wahrscheinlich kommen sie durch Verquellung der oberflächlichen Partien der Endknöpfchen oder Endnelken zustande und stellen daher eigentlich nicht ein Secret, sondern eher einen Bestandteil des Porenapparates dar. In diesem Sinne aufgefaßt, bildet die aus Prismen zusammengesetzte Gallerthülle der Desmidiaceen des *Cosmarium*typus einen integrierenden Bestandteil der Zellmembran, freilich einen ziemlich veränderlichen, da sie unter günstigen Bedingungen sich mächtig entwickeln, unter ungünstigen vollständig schwinden, später aber wieder neu gebildet werden kann". (LÜTKEMÜLLER 1902, S. 402 und 403.)

Nach der elektronenmikroskopischen Bestätigung der Existenz eines Porenapparates bei *Micrasterias papillifera, Cosmarium Lundelii* (CHARDARD u. ROUILLER 1957) und *Hyalotheca dissiliens* (DRAWERT u. METZNER-KÜSTER 1961) ist zu untersuchen, ob sich dieses Gebilde auch in entsprechender Form, wie es LÜTKEMÜLLER beschreibt, bei anderen Desmidiaceen nachweisen läßt, zumal nach Beobachtungen von CZURDA (1937) die Porenapparate nur in entsprechend gealterten Membranen und bei bestimmter Substratreaktion in der angegebenen Form vorkommen dürften. Auch BARG (1942) erwähnt, daß sie bei *Micrasterias papillifera* und *M. truncata* trotz Färbung die von LÜTKEMÜLLER beschriebenen Einzelheiten des Porenapparates nicht erkennen konnte (für *M. papillifera* vgl. aber CHARDARD u. ROUILLER 1957). Ferner bleibt zu prüfen, ob die oben zitierte Vorstellung LÜTKEMÜLLERs von der Gallertbildung zutrifft.

Wir führten diese Untersuchungen vorwiegend an *Micrasterias rotata* (GREV.) RALFS und *Pleurotaenium trabecula* (EHRBG.) NÄG. durch. Zu Vergleichen wurde auch wieder *Hyalotheca dissiliens* (SM) BRÉB. hinzugezogen. Die Methodik ist der I. Mitteilung (DRAWERT u. METZNER-KÜSTER 1961) zu entnehmen.

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Porenapparate von *Micrasterias* und *Pleurotaenium*

Die Poren mit den Porenapparaten in den Zellwänden von *Micrasterias rotata* und *Pleurotaenium trabecula* sind gut im Phasenkontrast zu erkennen. Bei beiden Arten findet man sie zum Unterschied von *Hyalotheca* (vgl. DRAWERT u. METZNER-KÜSTER 1961, Abb. 17) über die ganze Oberfläche verstreut angeordnet, wie Abb. 1 für *Pleurotaenium* belegt. Nach Färbungen mit Methylviolett, Nilblau oder Rutheniumrot treten die Porenapparate besonders deutlich hervor (Abb. 2 und 4). Dasselbe erwähnt WARIS (1950) von *Micrasterias Thomasiana* für Färbungen mit Gentianaviolett. Nach Behandlung mit Acridinorange-Lösungen zeigen die Porenapparate ebenso wie die Gallertfäden von *Micrasterias rotata* (s. S. 252) eine intensiv leuchtende, kupferrote Fluorescenz. Die Endknöpfchen stecken in je einem „Gallertprisma". Die Gesamtheit der

Gallertprismen bildet die Gallerthülle (Abb. 3). Es ergibt sich also, jetzt auch photographisch belegt, ein Bild, wie es bereits von HAUPTFLEISCH (1888) für *Pleurotaenium trabecula* entworfen worden ist, nur daß er die sogenannte Porenzwiebel übersehen hat, die erst LÜTKEMÜLLER (1902) bei anderen Arten entdeckte.

Es erscheint eigentlich unverständlich, daß, wie bereits oben erwähnt worden ist, bei Nachuntersuchungen die von den alten Autoren gesehenen und beschriebenen Strukturen immer wieder angezweifelt werden. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß bereits KLEBS (1886) auf das Abspringen der „Gallerthöcker" infolge äußerer Reize oder Einwirkung von Reagentien aufmerksam macht. Dasselbe erwähnt auch LÜTKEMÜLLER (1902, S. 357 und 402) und betont dabei, daß der Zusammenhang zwischen Gallertprismen und Endknöpfchen so fest ist, daß bei der Abstoßung der Gallertprismen die Endknöpfchen von den Porenfäden abreißen. Wir kommen auf diese Erscheinung später noch zurück (S. 247 u. f.).

Auch in der Aufsicht ergeben sich Bilder, wie sie bereits von HAUPTFLEISCH, SCHRÖDER und LÜTKEMÜLLER skizziert worden sind. Bei *Pleurotaenium* kann man die Endknöpfchen der Porenapparate gut erkennen, wie Abb. 6 zeigt. In der Aufnahme kommt der Größenunterschied zwischen dem Endknöpfchen und dem in der Pore steckenden Porenfaden gut heraus. Bei *Micrasterias rotata* sollen nach HAUPTFLEISCH Endknöpfchen und Hüllgallerte fehlen. Dieser Angabe ist bereits von LÜTKEMÜLLER (1895) und SCHRÖDER (1902) widersprochen worden. Wie aus Abb. 5 hervorgeht, besitzt *M. rotata* sehr gut ausgebildete Endknöpfchen, die sich nach oben trichterförmig erweitern. In der Abb. 5 sieht man sie in Seitenansicht. Nach Absaugen von Wasser werden durch den Druck des Deckglases die Gallertprismen und damit die Endknöpfchen zur Seite gedrückt. Für *Micrasterias Thomasiana* gibt WARIS (1950) an, daß "the 'pore-organs' can be pressed out from the cell-wall and are then, if stained, like small nails".

Hin und wieder kann bei *Micrasterias rotata* nach Färbung mit basischen Farbstoffen in der Hüllgallerte auch eine Struktur beobachtet werden, die an die „Stäbchen" bei *Hyalotheca* erinnert (Abb. 7 und 8). Bei *Hyalotheca* handelt es sich dabei wohl um die Grenzflächen der Gallertprismen (DRAWERT u. METZNER-KÜSTER 1961). Wieweit bei *Micrasterias* etwas Ähnliches vorliegt, kann noch nicht entschieden werden. Die Stäbchen entsprechen wahrscheinlich den „büscheltragenden" Porenapparaten, wie sie von HAUPTFLEISCH und SCHRÖDER für einige Arten dieser Gattung abgebildet werden. Wir vermuten auch einen Zusammenhang mit den nach LÜTKEMÜLLER (1902, S. 403) bei *Xanthidium armatum* und einigen anderen Arten hin und wieder auftretenden fädigen Fortsätzen der Porenapparate. LÜTKEMÜLLER nimmt an, daß es sich dabei um Porenfäden handelt, die durch das Endknöpfchen hindurchgewachsen sind.

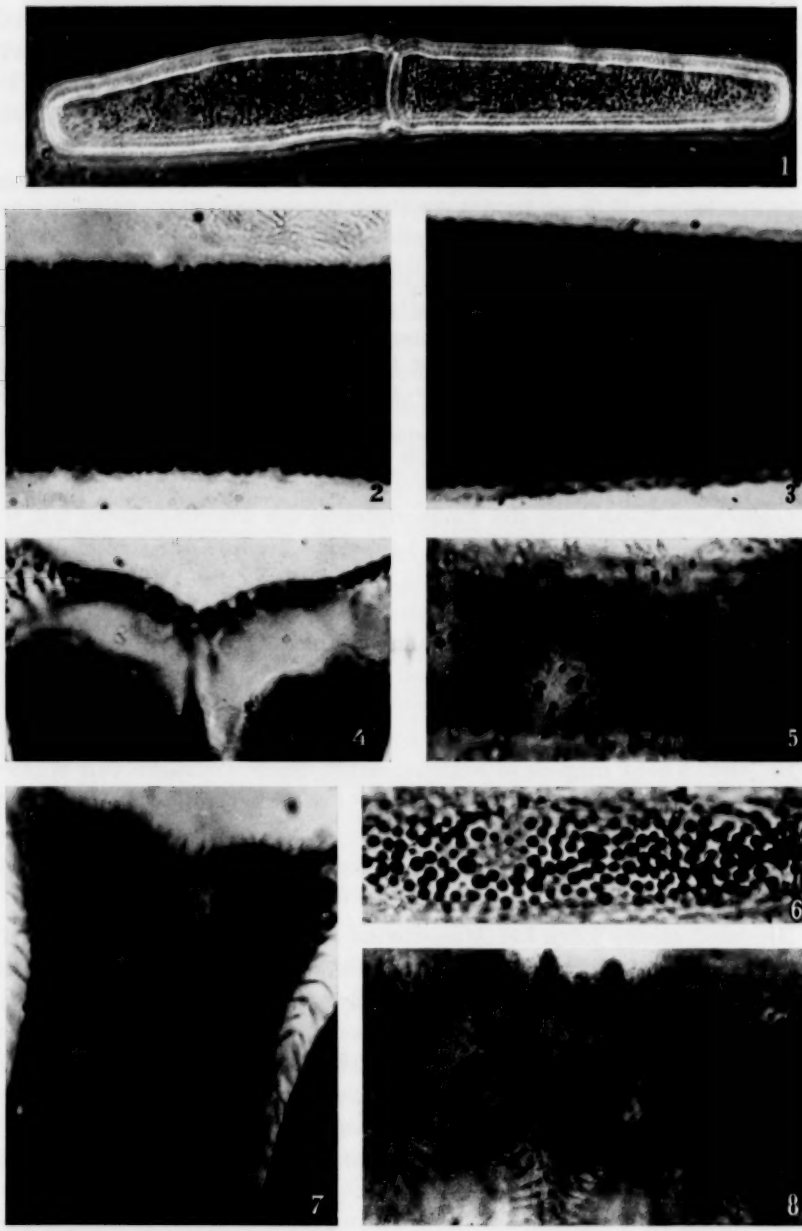


Abb. 1. *Pleurotaenium trabecula.* Verteilung der Poren in der Zellwand. Totes Objekt im Phasenkontrast. Vergr. 100, auf 300 nachvergr.

Abb. 2. *Pleurotaenium trabecula.* Porenapparate in der Zellwand nach Färbung mit Nilblau. Vergr. 380, auf 760 nachvergr.

Abb. 3—8. Legenden nebenstehend

Die „Stäbchen" können allerdings, wie bei *Hyalotheca*, auch den Grenzflächen der Gallertprismen entsprechen, da diese im elektronenmikroskopischen Bild manchmal deutlich hervortreten (Abb. 18). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die zur Färbung der „Stäbchen" benutzten Farbstoffe eine Entquellung der Gallerte bedingen (zuletzt KINZEL 1953), so daß Verschiebungen der Strukturen möglich sind.

3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Porenapparate von *Micrasterias*

Elektronenmikroskopische Aufsichtsbilder der Poren von *Micrasterias rotata* befinden sich bereits in der vorhergehenden Mitteilung (DRAWERT u. METZNER-KÜSTER 1961, Abb. 1 und 2). Einen Längsschnitt durch eine Pore ohne Porenapparat gibt Abb. 9 wieder. In den Aufsichtsbildern haben wir einen Porendurchmesser von 130—180 mμ gemessen, in guter Übereinstimmung damit hat die in Abb. 9 dargestellte Pore eine durchschnittliche Weite von 140 mμ. Über der Zellwand erkennt man zart angedeutet eine feinfaserige Struktur der Hüllgallerte.

Bei unbehandelten Zellwänden bleibt der Porenapparat im allgemeinen in der Pore stecken (Abb. 10—14). In Abb. 10 sind vier angeschnittene Porenapparate zu sehen, von denen drei die Porenzwiebel deutlich erkennen lassen. Diese ist nicht direkt in das Plasma eingebettet, sondern von einem besonderen Hof umgeben, den wir als „Gallerthof der Porenzwiebel" bezeichnen wollen. Es liegt ein Schrägschnitt durch die Zellwand vor, bei dem die Endknöpfchen abgeschnitten worden sind. Über der Zellwand ist wieder die feinfaserige Struktur der Hüllgallerte vorhanden. Abb. 11—13 zeigen Längsschnitte durch einen vollständigen Porenapparat. Die trichter- oder becherartige Form des Endknöpfchens ist, entsprechend der lichtmikroskopischen Aufnahme in Abb. 5, gut zu sehen. Aus Abb. 11 geht besonders deutlich hervor, daß das Endknöpfchen in die Hüllgallerte „ausfasert". In Abb. 14 sind nur die becherförmigen Endknöpfchen angeschnitten. Bei einer Kombination der Bilder 11—14 erkennt man, daß der Porenapparat ein

Abb. 3. *Pleurotaenium trabecula*. Porenapparate in der Zellwand einer jungen Zellhälfte mit Gallerthülle nach Färbung mit Methylviolett. Vergr. 610, auf 1220 nachvergr.

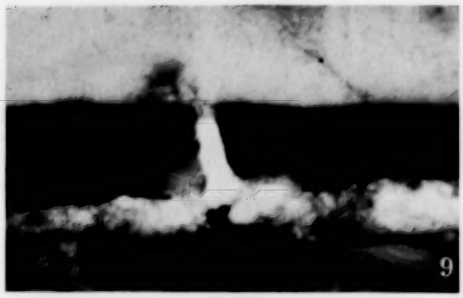
Abb. 4. *Micrasterias rotata*. Porenapparate am Ende eines Polarlappens nach Färbung mit Methylviolett. Vergr. 610, auf 1220 nachvergr.

Abb. 5. *Micrasterias rotata*. Die sich nach oben trichterförmig erweiternden Endknöpfchen der Porenapparate. In der Aufnahme durch Druck des Deckglases zur Seite gedrückt. Färbung mit Methylviolett. Vergr. 610, auf 1220 nachvergr.

Abb. 6. *Pleurotaenium trabecula*. Porenapparate in Aufsicht auf die Endknöpfchen. Färbung mit Rutheniumrot. Aufnahme im Phasenkontrast. Vergr. 380, auf 760 nachvergr.

Abb. 7. *Micrasterias rotata*. „Stäbchenstruktur" in der Hüllgallerte am Zellrand nach Färbung mit Nilblau. Vergr. 520, auf 1040 nachvergr.

Abb. 8. Wie Abb. 7 aber aus der Zellmitte in Aufsicht. Vergr. 340, auf 680 nachvergr.



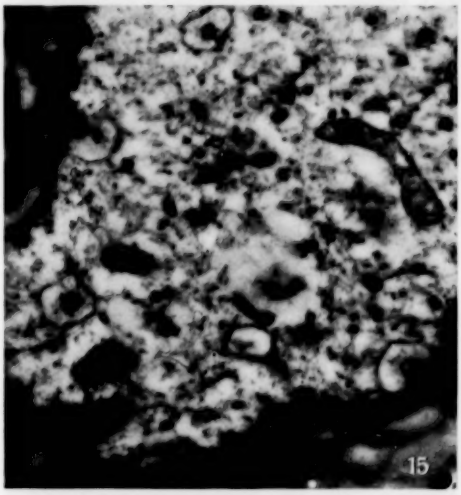


Abb. 9. *Micrasterias rotata*. Längsschnitt durch eine Zellwandpore ohne Porenapparat. Über der Zellwand ist die feinfaserige Struktur der Gallerthülle zart angedeutet. Vergr. 15000, auf 22500 nachvergr.

Abb. 10. *Micrasterias rotata*. Schnitt durch die Zellwand mit vier angeschnittenen Porenapparaten. Als elektronendichtes Gebilde hebt sich die Porenzwiebel deutlich ab. Jede Porenzwiebel ist von einem Gallerthof umgeben. Vergr. 7500, auf 11250 nachvergr.

Abb. 11—15. Legenden nebenstehend

röhrenförmiges Gebilde ist, das zum Plasma hin durch die Porenzwiebel ventilartig verschlossen wird.

In Flächenschnitten durch die Zellen im Bereich der Zellwand sind dicht unter der Wand die Gallerthöfe der Porenzwiebel sichtbar (Abb. 15). Dicht über der Wand geht der Schnitt durch die Hüllgallerte, die Endknöpfchen der Porenapparate werden quer getroffen (Abb. 16). Sie zeigen eine Zonierung, die bei stärkerer Vergrößerung deutlicher hervortritt (Abb. 17). In der Mitte befindet sich ein Porenkanal, der von einem substanzdichteren Mantel umgeben wird. Er ist nach außen scharf gegen eine dichtfaserige Hülle abgegrenzt, die wiederum in eine sehr lockerfaserig strukturierte Schicht übergeht. Diese Struktur in den beiden äußeren Schichten zeigt bevorzugt eine radiale Orientierung.

Bei einem Vergleich der Hüllgallerten von *Micrasterias* und *Hyalotheca* (Drawert u. Metzner-Küster 1961, Abb. 31 und 32) fällt auf, daß in den bisher gebrachten Aufnahmen von *Micrasterias* die für *Hyalotheca* so charakteristischen Begrenzungen zwischen den Gallertprismen fehlen; nur in Abb. 10 sieht man davon Andeutungen. Das kann damit zusammenhängen, daß die Hüllgallerte von *Micrasterias* nie die Mächtigkeit der von *Hyalotheca* erreicht. Die Gallertprismen üben keinen so starken Druck aufeinander aus wie es bei *Hyalotheca* wohl der Fall ist. Aus Abb. 18 geht aber hervor, daß auch bei *Micrasterias* die Grenzflächen der Gallertprismen im elektronenmikroskopischen Bild stärker hervortreten können. Bei *Micrasterias* lösen sich die Gallertprismen viel leichter ab als bei *Hyalotheca* (vgl. S. 248), so daß nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob in den Abb. 16 und 17 die Endknöpfchen der Porenapparate wirklich noch in Verbindung mit der Zellwand stehen.

4. Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Gallert- und Schleimausscheidung

Oltmanns (1922, S. 111) betont, daß es unbekannt ist, wie oft die Gallerthülle erneuert werden kann; „vermutlich kann sich der Vorgang

Abb. 11. *Micrasterias rotata*. Längsschnitt durch einen vollständigen Porenapparat mit Porenzwiebel und Gallerthof, anschließend der röhrenförmige Porenfaden, der sich nach außen in das Endknöpfchen erweitert. Das Endknöpfchen geht mit Fasern in die Hüllgallerte über. Vergr. 15000, auf 22500 nachvergr.

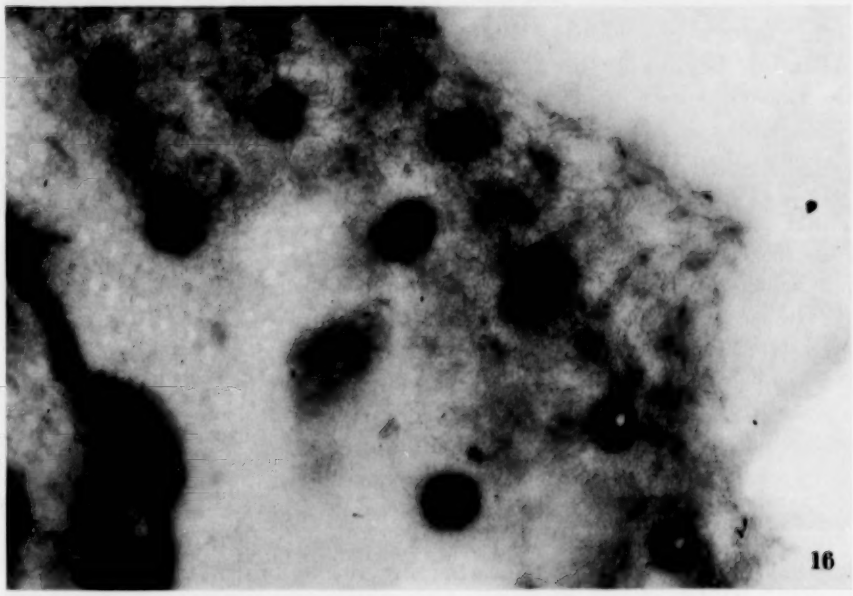
Abb. 12. Wie Abb. 11. Medianer Längsschnitt durch den Porenapparat, der gut die Trichter- oder Becherform des Endknöpfchens zeigt (vgl. Abb. 5). Vergr. 15000, auf 22500 nachvergr.

Abb. 13. *Micrasterias rotata*. In der Zellwand steckender Porenapparat. Vergr. 15000, auf 22500 nachvergr.

Abb. 14. *Micrasterias rotata*. Schnitt durch die becherartigen Endknöpfchen zweier Porenapparate nach $KMnO_4$-Fixierung. Vergr. 7500, auf 11250 nachvergr.

Abb. 15. *Micrasterias rotata*. Flächenschnitt dicht unter der Zellwand mit Gallerthöfen der Porenzwiebeln im Plasma. In der rechten oberen Hälfte ein Chondriosom. Vergr. 7500, auf 11250 nachvergr.

einige Male wiederholen", und KRIEGER (1937, S. 14) schreibt, daß in Kulturen häufig die Gallertausscheidung nach einiger Zeit eingestellt



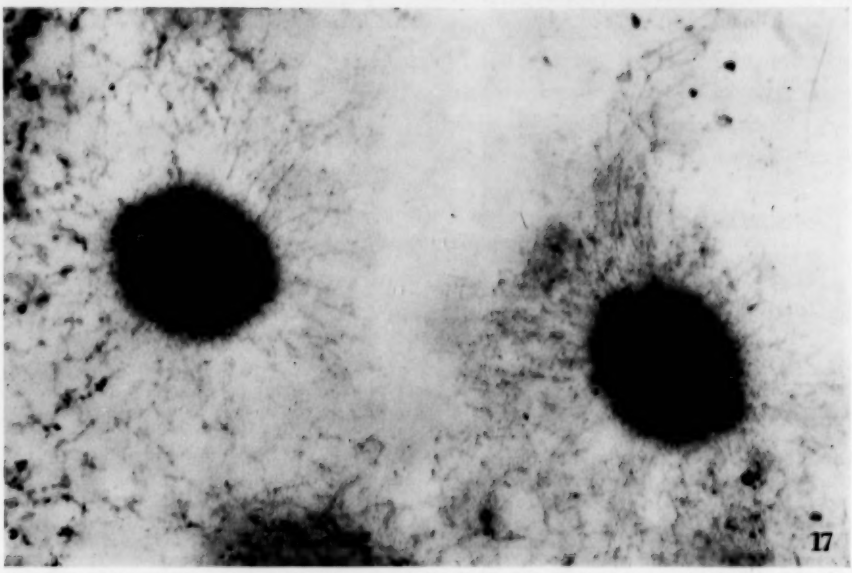


Abb. 16. *Micrasterias rotata*. Flächenschnitt dicht über der Zellwand durch die Hüllgallerte. Die Endknöpfchen der Porenapparate sind quer getroffen. Die Gallerte zeigt eine faserige Struktur. Vergr. 7500, auf 11250 nachvergr.

Abb. 17. *Micrasterias rotata*. Querschnitt durch die Endknöpfchen zweier Porenapparate. Die Endknöpfchen zeigen eine deutliche Zonierung. Vergr. 15000, auf 30000 nachvergr.

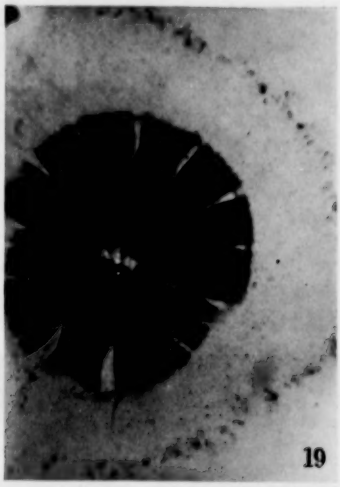
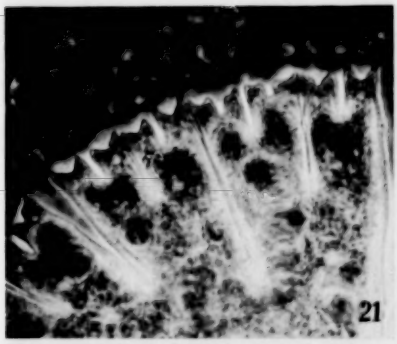
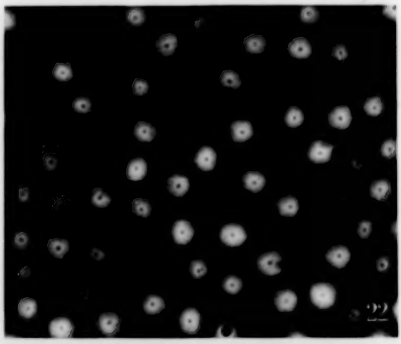


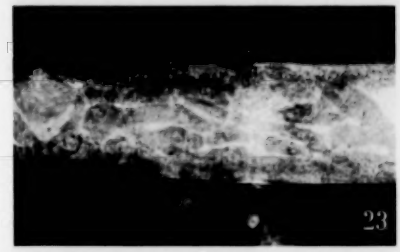
Abb. 18. *Micrasterias rotata.* Schnitt durch die Hüllgallerte mit quer getroffenen Endknöpfchen und hervortretenden Grenzflächen zwischen den einzelnen Gallertprismen. Vergr. 7500

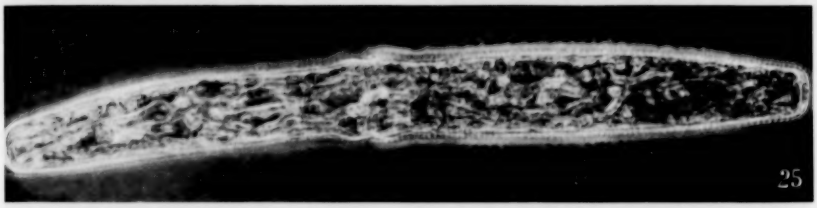
Abb. 19. *Micrasterias rotata.* Von der Oberfläche der Zelle abgedrückte Gallertprismen bilden um die Zelle einen „Gallertmantel". Vergr. 85, auf 170 nachvergr.

Abb. 20. *Micrasterias rotata.* Granula = abgerissene Endknöpfchen der Porenapparate in dem „Gallertmantel". Phasenkontrastaufnahme. Vergr. 380, auf 760 nachvergr.









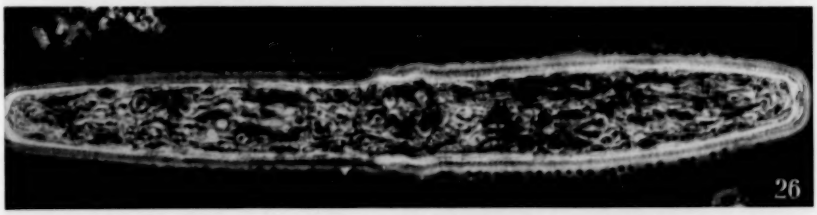


Abb. 21. *Micrasterias rotata.* Zelle in einer Tuschesuspension. Durch den Deckglasdruck ist die Prismengallerte von der Breitseite der Zelle abgedrückt und bildet einen breiten „Gallertmantel" (vgl. Abb. 19). An der Peripherie des dünner auslaufenden Zellenrandes ist die Prismengallerte noch als zusammenhängender Saum erhalten. Vergr. 240, auf 480 nachvergr.

Abb. 22. *Micrasterias rotata.* Isolierte Gallertprismen in einer Tuschesuspension. Durch Fortfall des gegenseitigen Druckes haben sich die Gallertprismen abgerundet. Das abgerissene Endknöpfchen des Porenapparates ist als dunkler Punkt in der Mitte der Kugeln zu erkennen. Vergr. 240, auf 480 nachvergr.

Abb. 23. *Pleurotaenium trabecula* in einer Tuschesuspension. An der jüngeren Zellhälfte (rechts) ist noch eine geschlossene Gallerthülle zu erkennen. Von der älteren Hälfte haben sich die Gallertprismen abgelöst. Vergr. 150, auf 375 nachvergr.

Abb. 24—26. Legenden nebenstehend

wird. Wirklich klare Angaben konnten wir über diesen Punkt in der Literatur nicht finden.

Bei der Beobachtung von *Micrasterias* im Phasenkontrast kann man vielfach um die Zelle einen breiteren „Gallertmantel" (Abb. 19) erkennen, der in recht konstanten Abständen Granula enthält (Abb. 20). Das führte uns zunächst in Zusammenhang mit der Vorstellung von Klebs (vgl S. 237) zu der Vermutung, daß Gallertgranula durch die Poren ausgeschieden werden, die im Außenmedium verquellen. Manchmal sieht man im mikroskopischen Präparat solche Granula scheinbar aus der Zelle herausschießen, die sich dann ganz regelmäßig einordnen. Dabei handelt es sich aber um eine Täuschung. Durch den Druck des Deckglases auf die Zelle werden die Gallertprismen von der Oberfläche der Zelle abgedrückt und regelrecht abgeschnippt. An der Peripherie des dünner auslaufenden Zellrandes bleibt die Gallerthülle noch als Saum erhalten, wie man in Tuschepräparaten gut erkennen kann (Abb. 21). Die isolierten Gallertprismen können, da sie sich nach Aufhebung des gegenseitigen Druckes abrunden, als Kügelchen in der Tuschesuspension schwimmen (Abb. 22). In ihnen kann man eine Zonierung erkennen, wie sie auch das elektronenmikroskopische Bild zeigt (Abb. 17). Der dunkle Punkt ist der innere, dichtere Teil des abgerissenen Endknöpfchens des Porenapparates mit Porenkanal. Dann folgt eine hellere Zone, die der äußeren „faserigen" des Endknöpfchens entsprechen dürfte, und daran schließt sich die stark hydratisierte periphere Zone an.

Das Abspringen der Gallertprismen läßt sich auch bei *Pleurotaenium trabecula* beobachten. Durch den Deckglasdruck werden zunächst nur die Gallertprismen der älteren Hälfte abgedrückt (Abb. 25). Mit einer Tuschesuspension kann nachgewiesen werden, daß die jüngere Zellhälfte tatsächlich noch eine geschlossene Gallerthülle besitzt, während die Gallertprismen der älteren Hälfte als isolierte Gallertkugeln in der Tusche schwimmen (Abb. 23). Werden auch die Gallertprismen der jüngeren Zellhälfte isoliert, so ist deutlich ein Größenunterschied zwischen den Endknöpfchen der Porenapparate zu erkennen (Abb. 26).

Man nahm bisher bei den jüngeren Zellhälften kleinere Poren an als bei den älteren und vermutete, daß sich die Poren nachträglich vergrößern. Dies ist aber bei der Struktur und der Art und Weise der Bildung der Desmidiaceen-Zellwand schwer vorstellbar. Sehr wahrscheinlich werden die Poren gleich mit ihrer endgültigen Weite angelegt, nur wird der in diesen Poren steckende Porenapparat

Abb. 24. *Pleurotaenium trabecula* in einer Tuschesuspension. Nach Abwurf der Hüllgallerte bleiben an den Zellpolen Gallertkappen erhalten. Vergr. 240, auf 480 nachvergr.

Abb. 25. *Pleurotaenium trabecula* mit abgedrückten Gallertprismen von der älteren Zellhälfte (rechts). Phasenkontrastaufnahme. Vergr. 100, auf 300 nachvergr.

Abb. 26. *Pleurotaenium trabecula* mit abgedrückten Gallertprismen. In der jüngeren Zellhälfte (links) sind die abgerissenen Endknöpfchen der Porenapparate noch kleiner als in der älteren. Phasenkontrastaufnahme. Vergr. 100, auf 300 nachvergr.

und besonders sein Endknöpfchen zunächst noch kleiner sein, so daß kleinere Poren vorgetäuscht werden.

Merkwürdigerweise bleibt bei *Pleurotaenium* die Gallerthülle an den Enden der Zelle immer erhalten, so daß die Zellen nach Abwurf der übrigen Hüllgallerte zwei polare Gallertkappen besitzen (Abb. 24). Hier muß die Verbindung des Porenapparates mit der Zellwand fester sein. Ob diese Erscheinung etwas mit dem Ausscheiden der Bewegungsgallerte an den Zellpolen zu tun hat, bleibt noch zu untersuchen.

Bedeutend fester sitzen die Gallertprismen der Hülle von *Hyalotheca*. Nur in seltenen Fällen — meist bei Einzellen — sind isolierte Gallertprismen, die sich kugelig abgerundet haben, zu beobachten (Abb. 27). Sehr wahrscheinlich sind es nur die Gallertprismen über der Querwand (vgl. DRAWERT u. METZNER-KÜSTER 1961, S. 221), die sich ablösen. Man kann auch hier wieder deutlich die Zonierung in den Gallertkugeln erkennen. Während in den isolierten, abgerundeten Gallertprismen von *Micrasterias* und *Pleurotaenium* die Endknöpfchen als runder Punkt erscheinen und nur bei starker Vergrößerung und entsprechender Lage ihre Trichterform erkennen lassen, besitzen die Endknöpfchen in den isolierten Gallertprismen von *Hyalotheca* eine bohnenartig gekrümmte Form (Abb. 27), die bereits bei schwächerer Vergrößerung wahrzunehmen ist.

Beim Ablösen der Hüllgallerte fällt auf, daß das Endknöpfchen des Porenapparates immer mit abgerissen wird. Diese Tatsache spricht ebenso wie die submikroskopische Struktur des Porenapparates dafür, daß die Hüllgallerte nicht durch den Porenkanal ausgeschieden wird. Wie es bereits LÜTKEMÜLLER vermutet, sind die Gallertprismen ein Teil des Porenapparates. Anders liegen die Verhältnisse bei der Bewegungsgallerte, die aber nur lokal ausgeschieden wird. An diesen bevorzugten Orten sind außerdem die Porenapparate häufig größer. Es fragt sich also, ob die Porenapparate nicht noch eine andere Funktion haben. In diesem Zusammenhang muß auf eine Erscheinung hingewiesen werden, die besonders auffällig bei *Hyalotheca* auftritt und bisher meist übersehen worden ist.

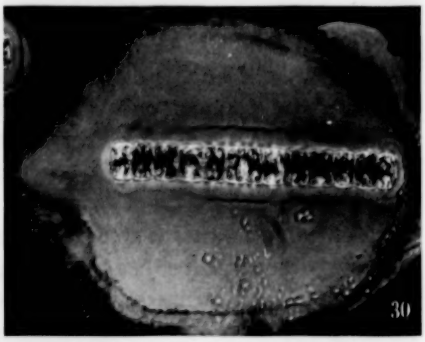
In Abb. 27 ist außer der Hüllgallerte und den isolierten abgerundeten Gallertprismen der Querwände einer Einzelzelle noch ein diffuser Schleimhof zu erkennen, den man auch durch Färbung mit Methylviolett und Anwendung des Phasenkontrastes sichtbar machen kann (Abb. 28). Am klarsten tritt er in Tuschesuspensionen in Erscheinung (Abb. 29).

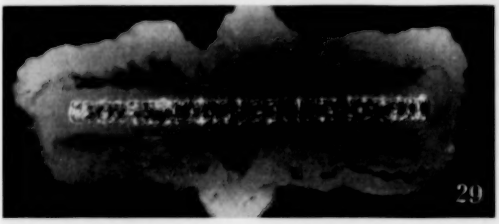
KINZEL (1953) beobachtete eine „Außenhülle" bei *Hyalotheca dissiliens* nach Färbung mit Methylenblau, Kongorot oder Muzicarmin. Wir vermuten, daß diese Außenhülle dem von uns dargestellten Schleimhof entspricht, doch kann aus den Angaben von KINZEL nicht auf eine

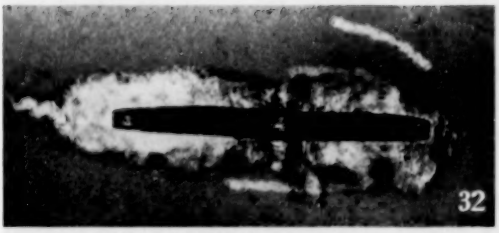
absolute Identität geschlossen werden. KINZEL (S. 31) nimmt an, daß es sich bei der Außenhülle um eine vom Zellfaden hervorquellende Gallertmasse handelt, die offenbar die in spezifischer Weise veränderte Scheide (= normale Gallerthülle) darstellt. Der von uns beobachtete Schleimhof hat dagegen direkt nichts mit der normalen Gallerthülle zu tun; denn diese bleibt, wie aus den Abb. 27—29 hervorgeht, im allgemeinen unverändert erhalten. Wenn hin und wieder zusätzlich eine schleimige Auflösung der Gallerthülle auftritt (Abb. 30), so handelt es sich wahrscheinlich um eine Degenerationserscheinung. Der einzige Autor, der nach unseren Kenntnissen den Schleimhof und seine Selbständigkeit neben der Hüllgallerte erkannt hat, ist ANDREESEN (1909), dessen Arbeit auch von KINZEL im Zusammenhang mit der von ihm beschriebenen Außenhülle zitiert wird. ANDREESEN beobachtete den Schleimhof bei *Hyalotheca dissiliens* nach Behandlung der Fäden mit Diastaselösung und anschließender Übertragung in eine Tuschesuspension. Wurden die so behandelten Präparate mit Neutralrot oder Methylenblau gefärbt, so trat eine intensive Schrumpfung ein und dabei stellte sich heraus, „daß in dieser gequollenen Masse eine Schicht von der ursprünglichen Breite der Gallerte unverändert deutliche Stäbchenstruktur zeigt, so daß also die Quellung nicht auf Kosten der Stäbchen geschehen ist" (S. 410). „Beim Durchsaugen von Wasser ging die geschrumpfte Quellmasse, bei der die Schrumpfung nicht zurückging, in Fetzen mit davon, so daß die Zelle anscheinend wieder ganz normale Hüllgallerte mit Stäbchenstruktur besaß, der man irgendwelchen Verlust infolge der vorgenommenen Prozedur nicht ansehen konnte. Welcher Art die bei Diastasebehandlung sich zeigende Quellmasse ist, ob sie überhaupt ein Quellprodukt der Gallerte ist und nicht etwa aus der Zelle selbst stammt, wurde nicht festgestellt. Manches spricht für die zweite Möglichkeit" (S. 411).

Nach unseren Beobachtungen kommt nur diese zweite Möglichkeit in Frage. Das Nächstliegende wäre natürlich, den Porenkanal des Porenapparates als Ausscheidungsort für den Schleim anzusehen. Wir haben allerdings bisher noch keine Anhaltspunkte für eine Fortsetzung des Porenkanals im Endknöpfchen durch die darüberliegende Gallerte, d. h. durch die stärker hydratisierte Schicht des Porenapparates; im Gegenteil scheint vieles dafür zu sprechen, daß sich der Porenkanal nicht bis zur äußeren Grenze der Hüllgallerte fortsetzt. Es ist aber durchaus anzunehmen, daß die wohl stärker hydratisierte äußere Schicht einem Schleimdurchtritt keinen allzu großen Widerstand mehr bieten dürfte.

Wenn wir auch die Abscheidung des Schleimes durch die Porenapparate für das Wahrscheinlichere halten, so muß doch die Möglichkeit einer Ausscheidung durch die anderen Zonen der Zellwand mit in Betracht gezogen werden. Dies könnte allerdings nur durch sehr kleine







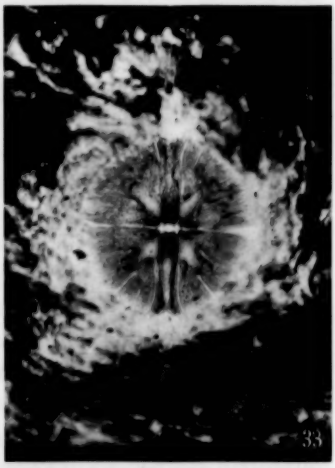


Abb. 27. *Hyalotheca dissiliens*. Einzelzelle in einer Tuschesuspension. Um die Zelle ist die Gallerthülle mit Stäbchenstruktur zu erkennen, darum lagert sich eine diffuse Schleimhülle, in der sich ebenso wie auch außerhalb derselben isolierte, abgerundete Gallertprismen von der Querwand befinden. Vergr. 150, auf 300 nachvergr.

Abb. 28. *Hyalotheca dissiliens* mit Gallerthülle und Schleimhof. Färbung mit Methylviolett. Phasenkontrastaufnahme. Vergr. 55, auf 110 nachvergr.

Abb. 29. Wie Abb. 28, aber in einer Tuschesuspension. Vergr. 55, auf 110 nachvergr.

Abb. 30. *Hyalotheca dissiliens* mit Schleimhof und beginnender Auflösung der Gallerthülle. Präparat in einer Tuschesuspension. Phasenkontrastaufnahme. Vergr. 55, auf 110 nachvergr.

Abb. 31—33. Legenden nebenstehend

Poren geschehen; denn elektronenmikroskopisch haben wir bisher keine Poren außer denen für die Porenapparate nachweisen können.

Die alten Autoren erwähnen allerdings für einige Desmidiaceen neben den Porenfäden der Porenapparate noch „Fäden von durchaus gleichmäßiger Dicke, welche die äußere Zellhautschicht allein durchqueren" (LÜTKEMÜLLER 1902, S. 350), und die nach Behandlung der Zellen mit basischen Farbstoffen sichtbar werden sollen. Bei den von uns untersuchten Objekten haben wir bis jetzt keine Anhaltspunkte für die Existenz solcher Gebilde gefunden. Außerdem ist noch zu berücksichtigen, daß es sich dabei nur um Strukturen der äußeren Zellwandschicht handelt, es können also nach den Angaben der Autoren keine Durchbrechungen der ganzen Wand vorliegen. Sollte die Zellwand allgemein für den Schleim durchlässig sein, so bildet die Gallerthülle erst recht kein Hindernis mehr, da sie keine geschlossene Röhre darstellt, sondern aus einzelnen Gallertprismen zusammengesetzt ist. Wie aus Abb. 31 zu ersehen ist, können bei *Hyalotheca* ganze Protoplasten durch die Gallerthülle hindurchtreten, ohne daß sich diese dabei stärker verändert. Bei zunehmendem Deckglasdruck platzen einzelne Zellen des Fadens bevorzugt an der Verbindungsstelle der beiden Zellhälften, der Protoplast wird regelrecht durch die Gallerthülle hindurchgeschossen und bleibt im Schleimhof liegen. In Abb. 31 deutet noch ein zarter dunkler Streifen den Weg des Protoplasten durch die Gallerthülle an.

Wir können bisher noch nicht sagen, ob es sich bei der Schleimabscheidung um einen Vorgang handelt, der auch im natürlichen Milieu abläuft oder ob es sich nur um die Folge eines Reizes handelt. ANDREESEN erwähnt die Schleimbildung nur von Zellen, die vorher mit Diastaselösung behandelt waren. Wir mußten die Zellen zur Sichtbarmachung des Schleims färben oder in eine Tuschesuspension überführen. Es ist durchaus möglich, daß erst durch diese Prozeduren die Schleimabscheidung ausgelöst worden ist. Davon abgesehen, muß aber die Zelle auf alle Fälle die Fähigkeit zur Schleimbildung und -abscheidung besitzen.

Es bleibt noch zu prüfen, ob es sich bei der Schleimabscheidung um eine spezifische Eigenschaft von *Hyalotheca* handelt. Wie Abb. 32 belegt, ist *Pleurotaenium trabecula* ebenfalls dazu befähigt. Abweichend scheint sich aber *Micrasterias rotata* zu verhalten. Bei diesem Objekt

Abb. 31. *Hyalotheca dissiliens* in einer Tuschesuspension mit zwei durch Deckglasdruck geplatzten Zellen innerhalb des Fadens und einer geplatzten Endzelle. Die Protoplasten sind durch die Gallerthülle hindurchgedrückt worden und bleiben im Schleimhof liegen. Phasenkontrastaufnahme. Vergr. 55, auf 110 nachvergr.

Abb. 32. *Pleurotaenium trabecula* mit Schleimhof in einer Tuschesuspension. Vergr. 55, auf 110 nachvergr.

Abb. 33. *Micrasterias rotata* mit Gallertfäden in einer Tuschesuspension. Vergr. 55, auf 110 nachvergr.

konnten wir nie einen zusammenhängenden Schleimhof beobachten. Die Kulturen enthalten aber in großer Zahl Gallertfäden, die sich häufig beim Verrühren eines Kulturtropfens mit Tusche zur Präparatherstellung dicht um die Zellen legen (Abb. 33). Die Gallertfäden entstehen in einer derartigen Menge, daß es sich kaum nur um Bewegungsgallerte handeln kann. Es scheint auch einiges dafür zu sprechen, daß diese Gallertfäden nicht nur an den Enden der polaren Lappen abgeschieden werden wie die Bewegungsgallerte; doch können wir darüber noch keine definitive Auskunft geben. In diesem Zusammenhang ist es noch von Interesse, daß HYGEN (1941) bei *Micrasterias denticulata* eine rasche Ansäuerung des Milieus in der nächsten Umgebung der Zellen beobachtet hat und vermutet, daß dies auf der Ausscheidung schwach saurer Schleim- oder Gallertsubstanzen beruhen könnte.

5. Besprechung der Ergebnisse

Die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen auch für *Micrasterias rotata* und *Pleurotaenium trabecula*, daß sich die Gallerthülle, wie bei *Hyalotheca dissiliens*, aus einzelnen Gallertprismen zusammensetzt, die ihren Ausgang von den sogenannten Porenapparaten nehmen.

Die in der Literatur immer wieder anzutreffenden Angaben, daß sich besonders bei Zellen aus Kulturen keine Gallerthülle nachweisen läßt (zuletzt CHARDARD u. ROUILLER 1957), ist wohl darauf zurückzuführen, daß sich die Gallertprismen, vor allem bei *Micrasterias*, sehr leicht absprengen lassen. Dazu genügt unter Umständen schon der Druck des Deckglases. Die von CHARDARD u. ROUILLER untersuchten *M. papillifera*-Zellen müssen entgegen der Meinung der Autoren noch eine Gallerthülle gehabt haben. Das geht aus der von ihnen gebrachten elektronenmikroskopischen Aufnahme hervor. Der dort (Abb. 1) dargestellte Porenapparat besitzt noch ein Endknöpfchen. Da es sich bei der Hüllgallerte um eine Verquellung des Endknöpfchens handelt, dürfen Zellen ohne Hüllgallerte auch keine Endknöpfchen mehr besitzen.

Die Porenapparate stecken wie Nieten in der Zellwand. Für *Micrasterias* kann der von LÜTKEMÜLLER postulierte Bau der Porenapparate elektronenmikroskopisch im wesentlichen bestätigt werden. Aus den Aufnahmen ergibt sich das in Abb. 34 skizzierte Schema. In der Zellwandpore steckt der „Porenfaden", der ein röhrenförmiges Gebilde darstellt und sich nach außen becherförmig zum „Endknöpfchen" erweitert. Nach innen wird der Porenkanal des Porenfadens durch die „Porenzwiebel" abgeschlossen. Die Porenzwiebel hat die Gestalt eines Polsternagels, der mit seinem Stift in den Porenkanal ragt. Eine engere Verbindung zwischen Porenfaden und Porenzwiebel scheint nicht zu bestehen, sondern die Porenzwiebel sitzt in dem Porenkanal wie das Verschlußstück eines Waschbeckens in der Abflußöffnung. Das Endknöpfchen verquillt an seiner Peripherie zur „Prismengallerte" und läßt

deutlich drei Zonen erkennen. Dieselbe Verquellung und Zonierung zeigt auch die Porenzwiebel, die so nach innen einen Gallerthof bildet. Diesen Gallerthof der Porenzwiebel haben ohne Zweifel auch CHARDARD u. ROUILLER (1957) in ihren elektronenmikroskopischen Aufnahmen gesehen; denn sie erwähnen, daß unter der Mündung des Porenapparates eine Loslösung des Plasmas von der Zellwand zu bemerken ist, so daß ein linsenförmiger, leerer Raum ausgespart wird.

Aus dem elektronenmikroskopischen Bild geht wohl einwandfrei hervor, daß es sich bei den Gallertprismen *nicht um ein Ausscheidungsprodukt durch den Porenapparat handeln kann, sondern nur um die stärker*

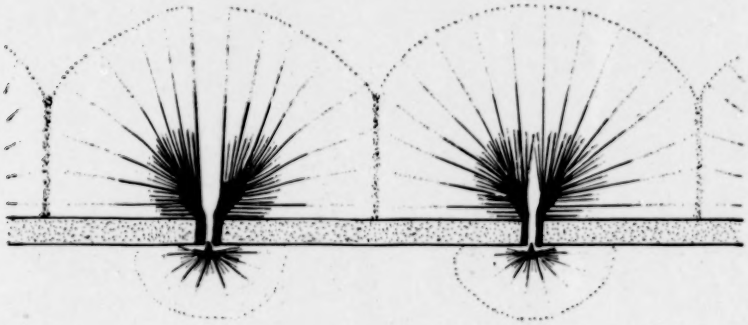


Abb. 34. *Micrasterias rotata.* Der sich aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergebende Bau des Porenapparates. Näheres siehe Text

hydratisierte periphere Schicht des Endknöpfchens, die in dem Gallerthof der Porenzwiebel ihr Gegenstück nach innen besitzt. Wie es bereits von LÜTKEMÜLLER (vgl. S. 238) vermutet worden ist, sind Porenapparat und Gallertprisma ein Gebilde.

Bei *Micrasterias rotata* und *Pleurotaenium trabecula* lassen sich Gallertprismen mit Endknöpfchen relativ leicht von der Zellwand absprengen, während das bei *Hyalotheca dissiliens* nur wesentlich schwerer möglich ist. Ob die abgesprengten Gallertprismen wieder ersetzt werden können, entzieht sich noch unserer Kenntnis.

Ferner muß auch die Frage offenbleiben, ob sich der Porenkanal durch die stark hydratisierte Schicht bis nach außen fortsetzt (Abb. 34a) oder in ihr blind endet (Abb. 34b).

Auf Grund der beobachteten Schleimausscheidung bei *Hyalotheca* und *Pleurotaenium*, sowie der Bildung von Gallertfäden bei *Micrasterias* ist es sehr naheliegend, in den Porenapparaten Ausscheidungsorgane zu sehen; schon der bei einigen Desmidiaceen vorhandene besondere Bau der Porenapparate an den Orten der Ausscheidung von Bewegungsgallerte spricht dafür. Andererseits könnte man aber in den Porenapparaten auch eine Schutzeinrichtung gegen Austrocknung der Zellen

sehen. Im gequollenen Zustand wäre ein Wasserdurchtritt in beiden Richtungen leicht möglich, bei einer Entquellung werden die relativ großen Poren in der Membran verschlossen. Es wäre dann besser, statt von einem „Porenapparat" von einem „Gallertpfropfen" zu sprechen. Doch können wir vorläufig über die Funktion nur Vermutungen äußern.

Die Ausscheidung von Schleim, Gallertfäden und Bewegungsgallerte ist aber eine Tatsache, die zur Voraussetzung hat, daß irgendwo in der

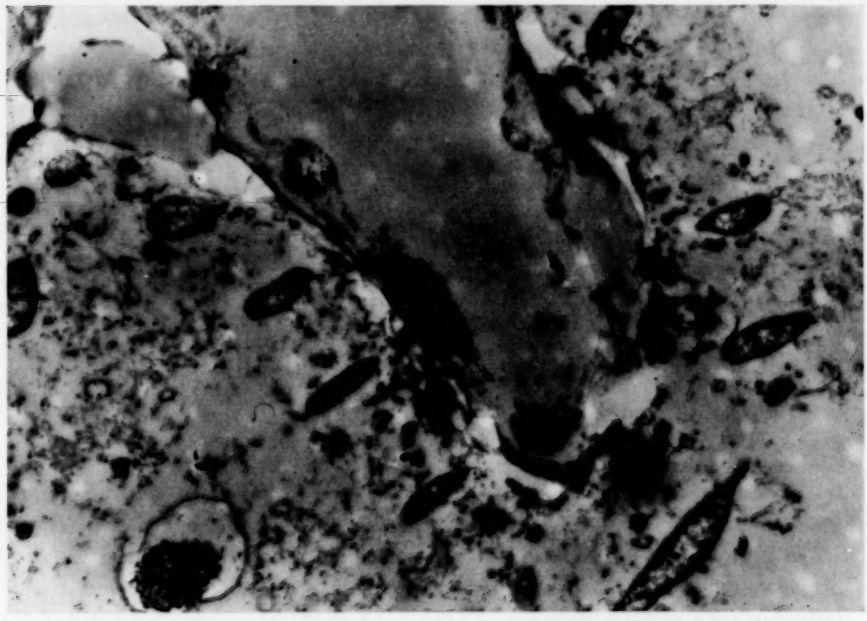


Abb. 35. *Micrasterias rotata*. Chondriosomen unter der Zellwand im Bereich der Gallerthöfe der Porenzwiebeln. Vergr. 7500, auf 11250 nachvergr.

Zelle Schleim und Gallerte bzw. deren Vorstufen gebildet werden müssen. Es bleibt daher zu prüfen, ob die elektronenmikroskopischen Aufnahmen irgendwelche Anhaltspunkte dafür bieten. Wir möchten ausdrücklich betonen, daß es sich bei den folgenden Ausführungen um reine Spekulationen handelt; denn es ist äußerst schwierig, nur aus dem elektronenmikroskopischen Bild Zuordnungen zu treffen und auf Funktionen zu schließen. In diesem Bereich versagt aber bisher noch die Beobachtung an der lebenden Zelle, so daß wir uns auf das Glatteis der Deutung elektronenmikroskopischer Bilder begeben müssen, ohne unser Auge durch die Beobachtung der *lebenden* Zelle vorher geschärft zu haben.

Zunächst ist es auffallend, daß häufig unter der Zellwand im Bereich des Gallerthofes der Porenzwiebel Chondriosomen anzutreffen sind (Abb. 35). Ferner findet man im Cytoplasma Gebilde, die wir auf

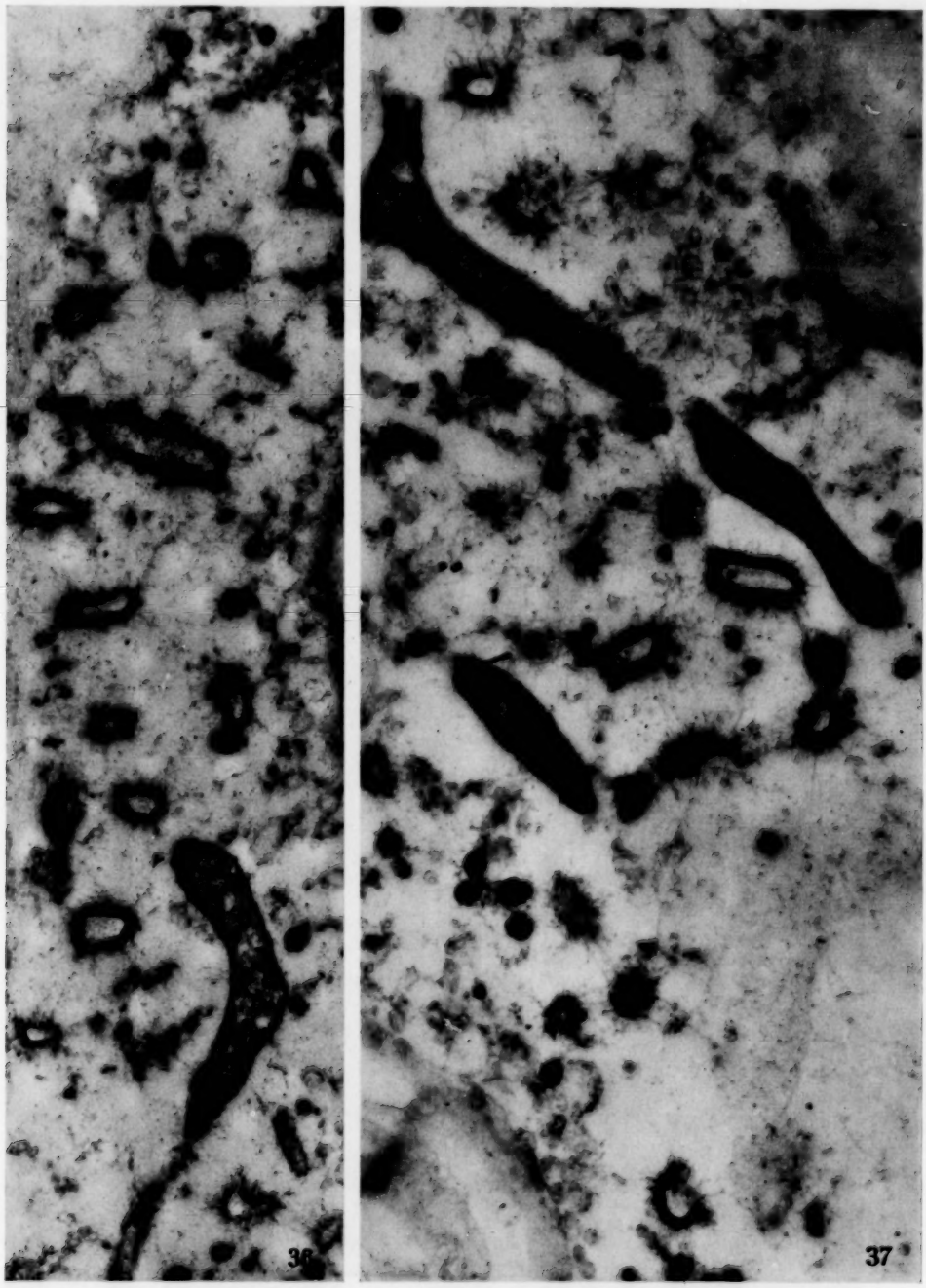


Abb. 36. *Micrasterias rotata.* Schleimartige Strukturen im Cytoplasma, in der unteren Hälfte ein Chondriosom. Vergr. 7500, auf 22500 nachvergr.

Abb. 37. *Micrasterias rotata.* Schleimartige Strukturen im Cytoplasma in der Umgebung von drei Chondriosomen. Vergr. 7500, auf 22500 nachvergr.

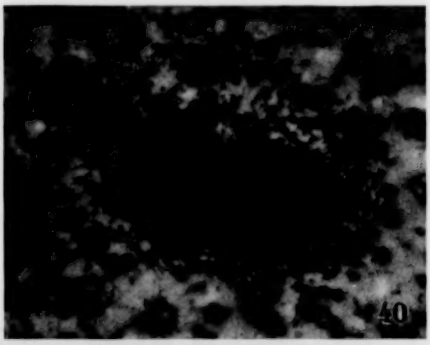


Abb. 38. *Micrasterias rotata.* Schleimartige Strukturen, die in direktem Zusammenhang mit einem Chondriosom zu stehen scheinen. Vergr. 7500, auf 22500 nachvergr.

Abb. 39. *Micrasterias rotata.* Golgiapparat an der Peripherie des Chloroplasten. Vergr. 15000, auf 45000 nachvergr.

Abb. 40. *Micrasterias rotata.* Schrägschnitt durch einen Golgiapparat mit Golgifeld. In der Umgebung des Golgifeldes „Schleimstrukturen". Vergr. 7500, auf 11250 nachvergr.

Grund ihrer Struktur für Gallerte oder Schleim halten möchten. Sie stellen entweder blasenartige Körper mit einer dichteren Peripherie, die faserig ausstrahlt, dar (Abb. 36 und 37) oder zeigen nur eine faserige Struktur (Abb. 37, 41 und 42). Im letzten Fall handelt es sich wahrscheinlich um Schnitte durch die faserige Peripherie der in Abb. 36 wiedergegebenen Einschlüsse. Diese Gebilde befinden sich oft in der Nähe von Chondriosomen (Abb. 37 und 38), so daß man geneigt ist, beides in einen Zusammenhang zu bringen.

Genausogut kann man aber auch auf Grund der Lageverhältnisse eine Beziehung der als Schleimstrukturen angesprochenen Gebilde zu den Golgiapparaten sehen.

Entsprechend den Angaben von CHARDARD u. ROUILLER (1957) für *Micrasterias papillifera* setzt sich auch bei *M. rotata* der Golgiapparat aus Doppellamellen zusammen, die flache Kapseln darstellen (Abb. 39), wie sie von HEITZ (1958) für die Golgiapparate der Mooszellen beschrieben werden. Jeder Golgiapparat baut sich aus durchschnittlich sieben solcher Doppellamellen auf. An der Peripherie gehen die flachen Kapseln in einzelne Bläschen über („Golgivacuolen", vgl. PERNER 1958, besser „Golgibläschen", vgl. SCHNEPF 1960). Besonders an den polaren Enden der schwach gekrümmten Golgiapparate werden auf diese Weise stark osmiophile Golgifelder (vgl. PERNER 1958) gebildet

Abb. 41. *Micrasterias rotata*. Drei Golgiapparate an der Peripherie des Chloroplasten mit Golgifeldern. In unmittelbarer Nähe der Golgiapparate „Schleimstrukturen". Vergr. 7500, auf 18750 nachvergr.

Abb. 42. *Micrasterias rotata*. „Schleimstrukturen" zwischen Chondriosomen in der Nähe der mit Poren versehenen Kernmembran. Vergr. 7500, auf 22500 nachvergr.

(Abb. 40 und 41). In Übereinstimmung mit CHARDARD u. ROUILLER (1957) haben auch wir die Golgiapparate meist in unmittelbarer Nachbarschaft der Chloroplasten beobachtet (z. B. Abb. 39 und 41), was aber nur durch die Raumverhältnisse in der *Micrasterias*-Zelle bedingt sein könnte.

Aus den Abb. 39—41 geht hervor, daß sich die als Schleimstrukturen angesprochenen Gebilde auch in der Nähe der Golgiapparate gehäuft befinden. In Parallele zu den Ausführungen von SCHNEPF (1960) über den möglichen Zusammenhang der Sekretbildung in den Drüsen von *Drosophyllum* mit dem Golgisystem könnte man auch bei den Desmidiaceen an dessen Beteiligung bei der Schleimbildung denken.

Wie vorsichtig man aber bei der Postulierung funktioneller Beziehungen allein aus der Lage von Organellen und Strukturen im elektronenmikroskopischen Bild sein muß, zeigt Abb. 42. Hier sieht man die als Schleimstrukturen angesprochenen Gebilde auch in unmittelbarer Nähe der mit Poren durchsetzten Kernmembran, auf die in einer folgenden Mitteilung näher eingegangen wird. Es dürfte allerdings nach unseren bisherigen Kenntnissen kaum ein direkter Zusammenhang zwischen Zellkern und Schleimbildung bestehen. Dazu muß nochmals betont werden, daß wir außer einer gewissen strukturellen Ähnlichkeit der schleimartigen Gebilde mit dem Gallerthof der Porenzwiebel nicht die geringsten Beweise in Händen haben, daß es sich dabei wirklich um Schleim handelt.

Am wahrscheinlichsten scheint uns eine Beteiligung der Golgiapparate an der Schleimbildung. Die dazu notwendigen Kohlenhydrate könnte der Chloroplast liefern. Vielleicht steht damit die auffällige Lage der Golgiapparate in unmittelbarer Nähe der Chloroplasten in Beziehung. Den Transport des Schleimes bis zur Zellwand wird wohl die bei den Desmidiaceen im allgemeinen sehr lebhafte Plasmaströmung besorgen. Den Chondriosomen könnte vielleicht eine Bedeutung für die Sezernierung des Schleimes durch die Zellwand zukommen.

Zusammenfassung

Die mosaikartige Zusammensetzung der Hüllgallerte aus einzelnen Gallertprismen kann für *Micrasterias rotata* und *Pleurotaenium trabecula* lichtmikroskopisch und für *Micrasterias* auch elektronenmikroskopisch entsprechend den Befunden an *Hyalotheca dissiliens* bestätigt werden.

Durch Druck können die Gallertprismen von der Zellwand abgesprengt und einzeln isoliert werden. Sie zeigen dann in Tuschepräparaten eine deutliche Zonierung. Der innerste Teil wird vom abgerissenen Endknöpfchen des Porenapparates eingenommen.

Elektronenmikroskopisch kann an *Micrasterias rotata* der von LÜTKEMÜLLER (1902) postulierte Bau der Porenapparate im wesentlichen bewiesen werden.

Die Prismengallerte wird nicht von den Porenapparaten ausgeschieden, sondern ist ein Teil derselben, wie es bereits von LÜTKE-MÜLLER vermutet worden ist. Sie stellt die stärker hydratisierte äußere Schicht des Endknöpfchens der Porenapparate dar.

Die Porenzwiebel besitzt einen den Gallertprismen der Endknöpfchen entsprechenden stärker hydratisierten Gallerthof, der in das Cytoplasma hineinragt.

Hyalotheca dissiliens und *Pleurotaenium trabecula* scheiden allseitig einen dünnflüssigen Schleim ab, *Micrasterias rotata* dagegen Gallertfäden. Es wird vermutet, daß die Porenapparate die Orte dieser Schleim- bzw. Gallertabscheidung sind. Den Porenapparaten kann aber auch eine Bedeutung als Schutzeinrichtung gegen das Austrocknen der Zellen zukommen.

Für *Micrasterias rotata* werden die Golgiapparate abgebildet und kurz beschrieben. Auf eine mögliche Beziehung der Golgiapparate zu der Schleim- bzw. Gallertbildung wird hingewiesen.

Frau Dr. INGEBORG METZNER-KÜSTER danken wir für die Anlage der Algenkulturen und für ihre Mitarbeit bei den Untersuchungen, ebenso danken wir Fräulein DÖRTHE ECKHARDT für ihre Hilfe. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die uns gewährten Mittel zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

zu Mitteilung I* und II

ANDREESEN, A.: Beiträge zur Kenntnis der Physiologie der Desmidiaceen. Flora (Jena) **99**, 373 (1909).

BARG, T.: Beiträge zur Zytomorphologie der Desmidiaceen. Arch. Protistenk. **95**, 391 (1942).

CHARDARD, R., et C. ROUILLER: L'ultrastructure de trois algues Desmidiées. Etude au microscope électronique. Rev. Cytol. et Biol. végét. **18**, 153 (1957).

CZURDA, V.: Conjugatae. In Hdb. der Pflanzenanatomie, Bd. VI. Berlin: Gebrüder Bornträger 1937.

DRAWERT, H., u. I. METZNER: Fluoreszenz- u. elektronenmikroskopische Beobachtungen an *Cylindrospermum* und einigen anderen Cyanophyceen. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 291 (1956).

— — Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Oscillatoria Borneti* Zukal. Z. Bot. **46**, 16 (1958a).

—, u. I. METZNER-KÜSTER: Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Beggiatoa alba* und *Thiothrix nivea*. Arch. Mikrobiol. **31**, 422 (1958b).

— — Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. I. Mitt. Zellwand- und Gallertstrukturen bei einigen Arten. Planta (Berl.) **56**, 213 (1961).

FREY-WYSSLING, A.: Die pflanzliche Zellwand. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

FRITSCH, F. E.: The structure and reproduction of the algae. Vol. I. Cambridge: University Press 1948.

* Planta **56**, 213—228 (1961).

Hauptfleisch, P.: Zellmembran und Hüllgallerte der Desmidiaceen. Mitt. naturwiss. Ver. Neuvorpom. u. Rügen **20**, 1 (1888).

Heitz, E.: Weitere Belege für das gesetzmäßige Vorkommen plasmatischer Lamellensysteme bei Pflanzen und ihre identische Struktur mit dem Golgi-Apparat bei Tieren. Z. Naturforsch. **13**b, 663 (1958).

Höfler, K.: Thioninfärbbarkeit der Zellmembranen von Süßwasseralgen. Protoplasma **48**, 522 (1957).

—, u. H. Schindler: Algengallerten im Vitalfärbeversuch. Öst. bot. Z. **99**, 529 (1952).

Hygen, G.: Über eine reversible, in Alkalisalzlösungen erfolgende Nukleolenverschmelzung bei *Micrasterias denticulata* Bréb. Bergens Museums Årbok 1941, Naturvitensk. rekke Nr 1.

Kinzel, H.: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. Öst. bot. Z. **100**, 25 (1953).

Klebs, G.: Über Bewegung und Schleimbildung der Desmidiaceen. Biol. Zbl. **5**, 353 (1885).

— Über die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. Unters. bot. Inst. Tübingen **2**, 333 (1886).

Krieger, W.: Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten. In Rabenhorsts Kryptogamenflora, Bd. **13**, 1. Abt., Teil 1. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1937.

Lhotský, O.: The pore-systems of the Desmidiaceae. Experientia (Basel) **5**, 158 (1949).

Lütkemüller, J.: Die Poren der Desmidiaceengattung *Closterium* Nitzsch. Öst. bot. Z. **44**, 11 (1895).

— Die Zellmembran der Desmidiaceen. Beitr. Biol. Pflanz. **8**, 347 (1902).

Metzner, I.: Zur Chemie und zum submikroskopischen Aufbau der Zellwände, Scheiden und Gallerten von Cyanophyceen. Arch. Mikrobiol. **22**, 45 (1955).

Myers, A., and R. D. Preston: Fine structure in the red algae. III. A general survey of cell-wall structure in the red algae. Proc. roy. Soc. B **150**, 456 (1959).

Oltmanns, F.: Morphologie und Biologie der Algen, 2. Aufl., Bd. 1, Jena: Gustav Fischer 1922.

Perner, S.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytomorphologie des sogenannten „Golgisystems" in Wurzelzellen verschiedener Angiospermen. Protoplasma **49**, 407 (1958).

Schnepf, E.: Zur Feinstruktur der Drüsen von *Drosophyllum lusitanicum*. Planta (Berl.) **54**, 641 (1960).

Schröder, B.: Untersuchungen über Gallertbildungen der Algen. Verh. naturhist.-med. Ver. Heidelberg **7**, 139 (1902).

Schussnig, B.: Handbuch der Protophytenkunde, Bd. II. Jena: Gustav Fischer 1960.

Waris, H.: Cytophysical studies on *Micrasterias*. I. Nuclear and cell division. Physiol. Plantarum (Cph.) **3**, 1 (1950).

Wisselingh, C. van: Über die Zellwand von *Closterium*. Z. Bot. **4**, 337 (1912).

Prof. Dr. H. Drawert,
Botanisches Institut der Universität, Marburg a. d. Lahn, Pilgrimstein 4

Planta 56, 262—289 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover
und dem Botanischen Institut der Universität Würzburg

UNTERSUCHUNGEN ÜBER PHOSPHORYLIERUNGSPROZESSE BEI DER PHOTOSYNTHESE HÖHERER PFLANZEN (*HELODEA*) UNTER VERWENDUNG VON RADIOAKTIVEM PHOSPHAT

Von

GÜNTER WEICHART

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. September 1960)

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit sollten einige phosphorylierte organische Verbindungen ermittelt werden, die an der Photosynthese von *Helodea* beteiligt sind. Dabei war zu berücksichtigen, daß bei den grünen Pflanzen verschiedene durch Licht beeinflußbare Phosphorylierungs-Reaktionen ablaufen dürften (SIMONIS 1960, dort weitere Literatur). Vier Vorgänge, die im Licht eine Förderung der Bildung organischer P-Verbindungen gegenüber Dunkelheit hervorrufen können, lassen sich unterscheiden, und zwar:

1. Die Photosynthese-Phosphorylierung. Sie umfaßt die durch photochemische Energie primär in den Chloroplasten bewirkten und an isolierten Chloroplasten bei Belichtung nachgewiesenen Phosphorylierungsprozesse (ARNON u. Mitarb. 1954, 1955, 1956; weitere Literatur ARNON 1955, 1959, 1960).

2. Die Phosphorylierung der bei der CO_2-Assimilation auftretenden Zwischenprodukte (Calvin-Cyclus; CALVIN 1956).

3. Die photosensibilisierte Phosphorylierung. Diese von SIMONIS und EHRENBERG (1957) an chlorophyllfreiem Gewebe (Haferwurzeln und Hefe) wahrscheinlich gemachte lichtabhängige Phosphorylierung hat weder substantiell noch energetisch etwas mit der Photosynthese zu tun, besteht vielmehr darin, daß gewisse Stoffwechselprozesse durch Licht gefördert werden (vgl. GORDON und SURREY 1958; SIMONIS 1960). Der Energiebedarf wird dabei durch Glykolyse und Atmungsvorgänge gedeckt.

4. Die bei Belichtung auftretende Erhöhung der Phosphataufnahme (vgl. BRAUNER 1956; PIRSON und KUHL 1958).

Von diesen 4 Vorgängen, die wahrscheinlich alle ineinandergreifen, stehen offenbar nur die beiden ersten unmittelbar mit der Photosynthese in Zusammenhang. Die beiden anderen werden wahrscheinlich entweder dadurch verursacht, daß die Aktivität von Fermenten sowie die Viscosität und die Permeabilität des Plasmas durch Licht verändert werden

können, oder dadurch, daß die Photosynthese sekundär die Phosphataufnahme beeinflußt. Da die Vorgänge 3 und 4 imstande sind, die Mengen an phosphorylierten Verbindungen im Licht zu vergrößern, kann bei einem Vergleich der im Hellen gebildeten organischen P-Verbindungen mit den im Dunkeln gebildeten eine unmittelbare Beteiligung gewisser P-Verbindungen an der Photosynthese gegebenenfalls nur vorgetäuscht werden. Glücklicherweise ist nun die durch den Vorgang 3 und bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen auch die durch den Vorgang 4 verursachte Förderung der Phosphorylierung nur *geringfügig* und klein gegenüber der durch die beiden anderen Vorgänge verursachten. Man kann daher hier immer dann eine Aussage über die Beteiligung einer bestimmten Substanz an der Photosynthese machen, wenn die gefundenen Unterschiede zwischen der Phosphorylierung im Hellen und im Dunkeln groß genug sind.

Benutzt man für die Untersuchung der bei der Photosynthese auftretenden P-Verbindungen radioaktiven Phosphor (^{32}P), wie es bei den in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Versuchen geschehen ist, so kann man *zwei verschiedene Verfahren* anwenden:

1. Man führt das radioaktive Phosphat in das Versuchsobjekt (einzellige Algen oder Blätter von höheren Pflanzen) ein und wartet so lange, bis das Verhältnis ^{32}P zu ^{31}P in allen Monophosphaten ebensogroß, bei den Diphosphaten doppelt so groß, bei den Triphosphaten 3mal so groß ist usw. wie beim anorganischen Orthophosphat (vgl. S. 269). Erst dann beginnt man mit dem eigentlichen (physiologischen) Versuch. Auf diese Weise kann man die in den untersuchten Zellen *enthaltenen* P-Verbindungen durch Messung ihrer Radioaktivität *quantitativ* bestimmen. Dieses Verfahren bietet gegenüber den üblichen chemischen Methoden den Vorteil, daß man auch äußerst geringe Substanzmengen, die sonst nicht einmal qualitativ nachweisbar wären, sehr genau quantitativ bestimmen kann.

2. Bei dem zweiten Verfahren wird das radioaktive Phosphat erst zu Beginn des Versuchs in das Objekt eingeführt. Unter bestimmten Bedingungen (s. S. 269f.) stellt dann die gemessene Radioaktivität ein Maß für die *während des Versuches neu gebildeten Substanzmengen* dar. Da auf diese Weise noch äußerst kleine Umsetzungen in den Zellen quantitativ verfolgt werden können — die Nachweisgrenze liegt bei 10^{-16} Mol —, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst nur dieses Verfahren angewendet.

Die gewonnenen Ergebnisse sind indessen noch nicht völlig sicher, weil man mit der Möglichkeit rechnen muß, daß gewisse Substanzen erst bei der Abtötung und Extraktion der Versuchspflanzen oder während der analytischen Auftrennung der Extrakte aus anderen, instabilen Zwischenprodukten entstehen (KANDLER 1957; METZNER, SIMON, METZNER und CALVIN 1957; SIMONIS, KATING und KUES 1957). Um etwaige Fehler, die sich auf diese Weise ergeben könnten, auszuschließen, kann man während des Versuchs in die lebenden Zellen einen Hemm-

stoff einführen, der vorwiegend die Umsetzung der fraglichen Substanz in ihr Folgeprodukt behindert. Bewirkt dieser Hemmstoff in den belichteten Zellen einer grünen Pflanze einen Anstau der betreffenden Substanz und gleichzeitig eine Abnahme der Menge ihrer Folgeprodukte, so stellt diese Substanz mit großer Wahrscheinlichkeit ein Zwischenprodukt der Photosynthese dar (vgl. SIMONIS und WEICHART (2) 1958, sowie WEICHART (1) 1959).

Material und Methode

A. Anzucht der Versuchspflanzen

Als Versuchsobjekt diente *Helodea densa*. Die Pflanzen wurden in Glasaquarien kultiviert. Neben dem Tageslicht erhielten sie eine zusätzliche Beleuchtung durch einige 60 Watt-Glühfadenlampen, und zwar täglich von 8 bis 20 Uhr. Die Beleuchtungsstärke an der Oberfläche der Aquarien betrug mittags im Winter durchschnittlich 3000 Lux (davon 2000 Lux Tageslicht), im Sommer durchschnittlich 5000 Lux (davon 4000 Lux Tageslicht).

Die Aquarien waren mit einer Nährlösung nach PALMGRANTZ (1953), die aber statt mit destilliertem Wasser unter Verwendung von Leitungswasser hergestellt worden war, gefüllt. Jede Woche wurden zwei Drittel der Nährlösung durch frische ersetzt. Drei Tage nach dem Wasserwechsel betrug der Gehalt an löslichem Phosphat (je nach der in den Aquarien enthaltenen Pflanzenmenge) 4—8 mg PO_4 je Liter.

B. Vorbereitung des Pflanzenmaterials für den Versuch

Am Vortage des Versuches wurden gesunde *Helodea*-Sprosse einem Aquarium entnommen und gründlich mit Leitungswasser gewaschen. Dann wurden die Blättchen mit einer Pinzette von den Sprossen abgezupft und auf eine Anzahl von Bechergläsern (50 ml) gleichmäßig verteilt. In jedes Becherglas kamen etwa 30 Blätter. (Der P-Gehalt betrug etwa 0,10 mg je Probe.) Die mit Blättern beschickten Bechergläser wurden bis zum Beginn des Versuchs 20 Std lang im Dunkeln aufbewahrt.

C. Einlagerung von radioaktivem Phosphor

Der radioaktive Phosphor — $3{,}6 \cdot 10^{-9}$ g ^{32}P entsprechen 1 Millicurie (mC) — wurde als trägerfreie radioaktive Orthophosphorsäure in verdünnter HCl von der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft (Göttingen) bezogen. Die gelieferte Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf die gewünschte Konzentration (wenn nicht anders angegeben, 0,08—0,18 mC/10 ml) verdünnt. Die fertige Lösung wurde 5 min lang gekocht und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Zur Einlagerung der radioaktiven Phosphorsäure in die Blätter wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Bei *kurzfristiger* Einlagerung von einigen Sekunden wurden die für die Versuche vorbereiteten Blätter in zylindrische Glasgefäße gebracht, die oben offen waren und unten einen gelochten Boden besaßen (Höhe 70 mm, Außendurchmesser 24 mm). Diese Gefäße wurden zuerst in die Lösung von radioaktiver Phosphorsäure (5 ml), die sich in Bechergläsern (25 ml) befand, eingetaucht. Nach Beendigung der Einlagerung wurden die Gefäße mit den Blättern aus der Lösung herausgenommen und nacheinander in mehrere mit destilliertem Wasser gefüllte Bechergläser getaucht, um die Blätter und Gläser von äußerlich anhaftendem $^{32}PO'''_4$ zu befreien.

Bei *länger* dauernder Einlagerung wurde eine besondere Apparatur benutzt, die in Abb. 1 im Aufriß dargestellt ist. Zunächst wurden die für den Versuch vorbereiteten Blätter — ebenso wie oben — in Glasgefäße mit gelochtem Boden gebracht (Höhe 95 mm, Außendurchmesser 35 mm). Diese wurden in den zylindrischen Raum *A* hineingestellt, auf dessen Boden ein Glasstab lag, der das Zu- und Abfließen der Flüssigkeit erleichtern sollte. Die radioaktive Lösung (15 oder 20 ml) wurde aus dem Ansatzgefäß *B* durch Betätigen des Dreiwegehahnes *C* von unten her in den Raum *A* eingelassen und nach Beendigung der Einlagerung durch das Rohr *D* abgelassen. Dann wurden das Einlagerungsgefäß und die darin befindlichen Blätter mehrfach mit destilliertem Wasser gespült, das durch das Ansatzrohr *E* dem Raum *A* zugeführt werden konnte. Während des Einlagerns und Spülens wurde die im Raum *A* befindliche Flüssigkeit von einem Gasstrom, der durch das unten zugespitzte Glasrohr *F* eingeblasen wurde, in ständiger Bewegung gehalten. Der kleine Schornstein *G* diente zum Abzug des Gases.

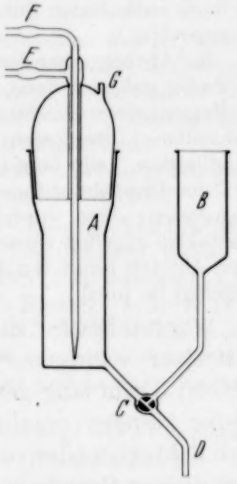


Abb. 1. Einlagerungsapparatur im Aufriß (etwa $^1/_2$ der natürlichen Größe). Näheres im Text

Bei den Hellversuchen wurde das Einlagerungsgefäß von unten her durch eine Mikroskopierlampe (6 Volt, 5 Amp.) oder durch eine 500 Watt-Lampe beleuchtet. Außerdem erhielten die Hellproben auch natürliches Tageslicht. Die Beleuchtungsstärke der Blätter lag, wenn nicht anders vermerkt, zwischen 4000 und 6000 Lux; davon waren 1000 Lux Tageslicht. Zum Kühlen der Apparatur wurde ein Ventilator verwendet.

Die *Hellproben* wurden vor der Einlagerung des $^{32}PO_4'''$ mit der gleichen Beleuchtungsstärke wie bei der Einlagerung selbst 10 min lang *vorbelichtet*, weil die *stationäre Phase der CO_2-Assimilation* untersucht werden sollte.

In Vorversuchen wurde die Aufnahme von radioaktiver Phosphorsäure in die Blätter aus der Abnahme der Radioaktivität der Einlagerungslösung ermittelt. Dabei zeigte sich, daß nach 20 min — länger wurde niemals eingelagert — die Radioaktivität der Außenlösung nur um etwa 6% abnahm und daß zwischen der Konzentration der radioaktiven Lösung und der ^{32}P-Aufnahme in die Blätter bis zu einer Konzentration von etwa 3 mC/10 ml (höhere Konzentrationen wurden in keinem Fall verwendet) lineare Abhängigkeit bestand.

In weiteren Vorversuchen wurde festgestellt, daß die äußerlich an den Blättern und an den Glaswandungen haftende Radioaktivität durch 3maliges Spülen mit je 25 ml destilliertem Wasser innerhalb von etwa 2 min praktisch vollständig entfernt werden konnte. Danach fand zwar auch noch eine *geringfügige* ^{32}P-Abgabe statt; da diese aber zeitlich fast konstant war, handelte es sich offenbar nicht mehr um eine Desorption, sondern um eine Abgabe aus dem Innern der Blätter durch Diffusion. Papierchromatographische Untersuchungen zeigten, daß nur Orthophosphat abgegeben wurde.

Da bei einigen Versuchen die Proben nach dem Einlagern und Spülen bis zum Abtöten verschieden lange in destilliertem Wasser aufbewahrt wurden (Nachbehandlung), konnte durch die allmähliche Auswaschung

von radioaktivem Orthophosphat eine relative Vermehrung der organischen ^{32}P-Verbindungen in den Blättern vorgetäuscht werden. Aus diesem Grunde wurde das destillierte Wasser, in dem sich die Proben während der Nachbehandlung befanden, gleich zum Extrahieren der Blätter benutzt (s. unten).

D. Abtötung und Extraktion der Blätter

Nach Beendigung der ^{32}P-Einlagerung und Spülung wurden die Blätter, gegebenenfalls nach einer gewissen Wartezeit (Nachbehandlung), abgetötet und die in ihnen enthaltenen Substanzen extrahiert. Dabei wurde das folgende Verfahren angewendet:

Zur Abtötung wurden die Blätter 2 min lang in 96%igem Äthylalkohol (10 ml je Probe) gekocht; dann wurden sie, nach Abgießen des Alkohols, zur Extraktion in Reagensgläser überführt und mit je 3 ml Wasser (gegebenenfalls von der Nachbehandlung) übergossen. Die Gläser wurden mit Wattestopfen versehen, zur Sterilisation 3 min lang im Wasserbad auf 100° C erhitzt und danach 20 Std bei 7° C im Dunkeln aufbewahrt. Die fertigen Extrakte wurden von den Blättern abgegossen; diese wurden mit destilliertem Wasser nachgespült, das dann den Extrakten zugefügt wurde. Die geringen Mengen am ^{32}P-Verbindungen, die in dem zum Abtöten benutzten Alkohol enthalten waren, wurden ebenfalls den Extrakten zugefügt (s. unten).

Wurden Blätter, die mit kochendem Äthanol abgetötet worden waren, mit einer wäßrigen $^{32}PO_4'''$-Lösung übergossen und anschließend (wie üblich) 5 min lang gekocht, so waren schon nach einigen Stunden *sehr kleine* Mengen organischer ^{32}P-Verbindungen nachweisbar (Tätigkeit von Bakterien oder von nichtzerstörten Fermenten der *Helodea*-Blätter). Aus diesem Grunde wurden bei vielen Versuchen der vorliegenden Arbeit Blindproben hergestellt. Die gefundenen Blindwerte wurden bei den Versuchsergebnissen stets berücksichtigt.

In einigen Versuchen wurden die Blätter zur Abtötung und gleichzeitigen Extraktion mit einer 10%igen wäßrigen Lösung von Trichloressigsäure (TES) behandelt.

Die in den Blättern ungelöst zurückgebliebenen ^{32}P-Verbindungen wurden nicht näher analysiert. Ihr Anteil an der von den Blättern insgesamt aufgenommenen ^{32}P-Menge war stets sehr klein; er betrug bei den gewählten kurzen Einlagerungszeiten nur einige Prozent.

E. Verarbeitung und Analyse der Extrakte

Zur Analyse der Extrakte wurden zwei verschiedene Verfahren benutzt:

1. Das *Fällungsverfahren*, wie von GRUBE (1953) beschrieben. Über Einzelheiten und Genauigkeit des Verfahrens vgl. WEICHART (1) (1959).

2. Das *papierchromatographische Verfahren*.

a) Herstellung der Chromatogramme. Der bei der Abtötung mit Äthanol angefallene Alkohol wurde in Kristallisierschälchen (25 ml) in einem heizbaren Vakuum-Exsiccator bei etwa 35° C über P_2O_5 in Gegenwart von $CHCl_3$ (zum Fernhalten von Bakterien) eingedampft. Dann wurden die zu den einzelnen Proben gehörenden Wasserextrakte in denselben Kristallisierschälchen eingetrocknet.

Der Trockenrückstand wurde mit 0,2 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Die so gewonnenen Konzentrate, die alle wasserlöslichen ^{32}P-Verbindungen enthielten, wurden in 2 ml-Röhrchen einpipettiert. Dabei wurde jede Probe in 2 oder 3 Teile geteilt, die unter Verwendung von verschiedenen Laufmitteln und Papiersorten chromatographisch analysiert wurden (s. unten). Die in den Schälchen zurückbleibenden kleinen Chlorophyllmengen wurden verworfen.

Für die zweidimensionale Chromatographie wurden die Konzentrate in den kleinen 2 ml-Röhrchen eingetrocknet. Der Rückstand wurde mit 25 mm^3 destilliertem Wasser aufgenommen.

Die TES-Extrakte (0,5—1,0 ml) wurden entweder unverändert gelassen oder gleich nach Beendigung der Extraktion, die 10—20 min dauerte, mit NH_3-Lösung neutralisiert.

Die fertigen Extrakte wurden mit Hilfe von Mikropipetten (0,1 ml) auf die Chromatogrammpapiere quantitativ (in Streifen oder punktförmig) aufgetragen.

Die Entwicklung der Chromatogramme wurde in einem Kellerraum in Glaskästen bei konstanter Temperatur (Winter 20° C, Sommer 20—22° C) durchgeführt. Es wurden nur Durchlaufchromatogramme (absteigend) angefertigt.

Die hauptsächlich verwendeten Laufmittel, Papiersorten und Laufzeiten waren folgende (vgl. auch Kues 1958, sowie Simonis, Kating und Kues 1957):

1. *Eindimensional:* a) Laufmittel: Äthanol—Wasser—Eisessig (Albaum 1952), 800 ml Äthanol, 8 ml Eisessig und 0,8 ml 1 n HCl, mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Papier: Schleicher & Schüll, Nr. 2045b (ausgewaschen). Laufzeit: 96 Std. — b) Laufmittel: n-Butanol — Wasser — Eisessig 74:50:19 (Vol.) (Benson u. Mitarb. 1950). Papier: Schleicher & Schüll, Nr. 2043b Mgl (ausgewaschen). Laufzeit: 72 Std. — c) Laufmittel: Methylglykol—3 n Ammoniak—Methyläthylketon 7:3:2 (Vol.) (Mortimer 1952). Papier und Laufzeit wie unter a oder b.

2. *Zweidimensional:* a) 1. Richtung: Wie 1a; 2. Richtung: wie 1c (Kombination A). — b) 1. Richtung: wie 1b; 2. Richtung: wie 1c (Kombination B).

Um die Auftrennung der ^{32}P-Verbindungen zu verbessern, wurde den Laufmitteln stets etwas Ammoniumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure (etwa 10^{-4} Mol/Liter Lösung) zugegeben.

b) Auswertung der Chromatogramme. Die fertigen Chromatogramme wurden in trockenem Zustand auf Agfa-Röntgenpapier (40×40 cm) zwischen zwei 4 mm dicke Glasplatten gelegt und im Dunkeln je nach der Höhe der Startaktivität 5—20 Tage aufbewahrt. Zur Entwicklung des Photopapiers diente Röntgen-Rapid-Entwickler (Agfa).

α) Qualitative Analyse. Die radioaktiven ^{32}P-Verbindungen, die auf dem Photopapier als schwarze Flecke in Erscheinung traten, wurden durch Cochromatographie identifiziert: Eine größere Menge eines radioaktiven Pflanzenextraktes wurde auf eine Reihe von kleinen Gläschen (2 ml) verteilt. Dann wurde zu jedem Gläschen eine bestimmte authentische Modellsubstanz zugegeben, und zwar für jeden Startfleck 30—60 mm^3 einer 0,2%igen wäßrigen Lösung.

Die Modellsubstanzen stammten von den Firmen: Boehringer (Mannheim), Bayer (Leverkusen), Pabst (Milwaukee), Sigma (St. Louis), Serva (Heidelberg) und Schwarz (New York). Die Modellsubstanzen wurden in destilliertem Wasser mit etwas Kationen-Austauscher (Dowex 50, in der H-Form) geschüttelt (Chromatographie der Säuren). Dabei gingen auch die schwer löslichen Barium- und Silbersalze vollständig in Lösung.

Die fertigen Chromatogramme wurden mit Molybdat-Reagens (Hanes und Isherwood 1949) besprüht, 1,5 min lang in einem Trockenschrank auf 85° C erhitzt, 5 min mit einer Quecksilberdampf-Lampe bestrahlt und schließlich einige

Minuten lang in einer NH_3-Atmosphäre aufbewahrt. Neben der blau angefärbten Modellsubstanz trat stets nur das anorganische Phosphat als blauer Fleck in Erscheinung, das zum kleineren Teil aus der Modellsubstanz, zum größten Teil jedoch aus dem benutzten Pflanzenextrakt stammte. Bei allen anderen von dem Pflanzenextrakt stammenden Substanzen reichte die vorhandene Menge zur Anfärbung *nicht* aus. Die Lage der Nukleotide wurde meistens durch Betrachten der Chromatogramme in UV-Licht bei 260 mμ ermittelt. Über weitere Identifizierungen vgl. KUES (1958).

β) Quantitative Analyse. Die Gesamtmenge aller wasserlöslichen ^{32}P-Verbindungen, die sich auf einem Chromatogramm befand, wurde aus der Startaktivität ermittelt, die mit einem Glockenzählrohr gemessen wurde. Die mit Hilfe der Autoradiographien sichtbar gemachten Flecke, die jeweils eine, manchmal auch zwei oder mehr ^{32}P-Verbindungen enthielten, wurden ausgeschnitten, ihre Radioaktivität mit einem Wannenzählrohr (FH 13, von Frieseke & Hoepfner) ausgemessen und unter Berücksichtigung der Halbwertszeit des ^{32}P auf den Versuchsbeginn umgerechnet.

F. Auswertung der Meßergebnisse

Die durch chromatographische Analyse gefundenen Meßwerte (Impulse je Minute) wurden auf die Summe aller wasserlöslichen ^{32}P-Verbindungen (Imp./min), die aus der Startaktivität ermittelt wurde (s. oben), bezogen und in „Mol-Prozenten des gesamten $^{32}P''$ angegeben. Hierdurch wurden Unterschiede der Bildung organischer ^{32}P-Verbindungen, die nur durch eine *unterschiedliche* $^{32}PO'''_4$*-Aufnahme* seitens der Blätter hervorgerufen wurden, mit der Photosynthese aber sehr wenig oder gar nichts zu tun hatten, weitgehend aufgehoben. Die durch die Photosynthese bedingte Mehraufnahme an $^{32}PO'''_4$ war wegen der Kürze der Einlagerung stets sehr klein und brauchte aus diesem Grunde nicht berücksichtigt zu werden.

Bei dem chromatographischen Verfahren betrug der mittlere Fehler der Einzelmessung (eingeschlossen der physiologische Fehler, der durch das Pflanzenmaterial verursacht wurde) $\pm 10\%$ des Meßwertes. Der *größte* Fehler der Einzelmessung lag bei $\pm 15\%$. Nur solche Meßwerte, die in der Größenordnung des Blindwertes lagen (0,02 Mol-% des gesamten ^{32}P), wiesen manchmal einen noch größeren Fehler auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Annahme gemacht, daß alle P-Verbindungen, also auch die Di- und Tri-Phosphate, jeweils nur *ein* ^{32}P-Atom enthielten. Dies war hier berechtigt — sofern man eine gleichmäßige Verteilung des ^{32}P in den Zellen voraussetzt —, weil sich das Mengenverhältnis ^{32}P-Verbindung : ^{31}P-Verbindung bei dem anorganischen Orthophosphat und bei den Monophosphaten in allen Versuchen etwa wie $1:10^7$ verhielt und demzufolge die Wahrscheinlichkeit, daß ein *radioaktives* Monophosphat mit einem *radioaktiven* Orthophosphat-Anion (unter Bildung eines Diphosphats) reagierte, verschwindend klein war gegenüber der Reaktionsmöglichkeit mit einem *nicht*-radioaktiven Orthophosphat-Anion. Eine gleichartige Überlegung gilt für die Bildung von Triphosphaten.

Weiterhin ergibt sich aus diesen Überlegungen nach den Regeln der Kombinatorik folgendes: Ist bei dem anorganischen Orthophosphat und bei den organischen Monophosphaten das Mengenverhältnis ^{32}P-enthaltende Verbindung zu nur ^{31}P-enthaltender Verbindung allgemein gleich $1:n$ (wobei *n eine sehr* große Zahl sein soll), so beträgt es bei den Diphosphaten (von denen nur die *einfach* radioaktiv markierten betrachtet zu werden brauchen) $2:n$ und bei den Triphosphaten (von denen auch nur die *einfach* markierten betrachtet zu werden brauchen) $3:n$. Will man nun aus der Menge der ^{32}P-Verbindungen die Menge der ^{31}P-Verbindungen ermitteln, was unter bestimmten Voraussetzungen möglich ist (s. unten), dann muß man diese Zahlenverhältnisse berücksichtigen.

Schließlich sei noch die Frage beantwortet, unter welchen Bedingungen die für die ^{32}P-Verbindungen gefundenen Analysenergebnisse auch für die Summe der ^{31}P- plus ^{32}P-Verbindungen (praktisch gleich der Menge an ^{31}P-Verbindungen allein) gelten. Bei dem Verfahren mit *langer* Einlagerungszeit (vgl. S. 263) dürfen die ^{31}P-Verbindungen immer dann in die Betrachtungen einbezogen werden, wenn das Verhältnis ^{32}P- : ^{31}P-Verbindung bei allen Monophosphaten ebensogroß, bei den Diphosphaten doppelt und bei den Triphosphaten 3mal so groß ist wie beim PO_4'''.

Anders liegen die Verhältnisse bei dem Verfahren mit *kurzer* Einlagerungszeit (vgl. S. 263), da sich hier das Verhältnis ^{32}P-Verbindung : ^{31}P-Verbindung bei allen Substanzen dauernd ändert. Aus Überlegungen, über die an anderer Stelle eingehend berichtet wird [WEICHART (1) und (2)], geht hervor, daß nur bei *Vergleichsversuchen*, in denen die Bildung organischer P-Verbindungen in Abhängigkeit von verschiedenen äußeren oder inneren Bedingungen untersucht wird (z. B. verschiedene Beleuchtungsstärken, verschiedene CO_2-Partialdrucke, mit bzw. ohne Hemmstoff), eine Einbeziehung der ^{31}P-Verbindungen in die Betrachtungen möglich ist, und das auch nur unter der Voraussetzung, daß die Versuche eine ganz bestimmte Zeit dauern. Da die zum Vergleich geeignete Versuchsdauer für die einzelnen Zwischenprodukte verschieden groß ist, müßte man, genaugenommen, für *jede* P-Verbindung *einen* Versuch von *bestimmter* Dauer durchführen. Ist man indessen bereit, einen gewissen quantitativen Fehler in Kauf zu nehmen, so kann man eine ganze Reihe von Substanzen gleichzeitig bestimmen, wenn man eine mittlere Versuchsdauer wählt, die allen Substanzen möglichst weitgehend gerecht wird. Diese mittlere Versuchsdauer, die für alle Zwischenprodukte annähernd richtige Werte für die Bildung von ^{31}P-Verbindungen liefert, läßt sich aus der Zeitabhängigkeit der Bildung organischer ^{32}P-Verbindungen ermitteln. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen liegt die optimale Dauer eines Vergleichsversuches für *Helodea* (bei Zimmertemperatur) zwischen 1 und 10 min

(am besten etwa 4 min; s. WEICHART 1959). Unter Beachtung dieser Bedingung gelten die für die ^{32}P-Verbindungen gefundenen Werte in erster Näherung auch für die ^{31}P-Verbindungen. Nur bei Ribulose-1,5-Diphosphat dürften die in Vergleichsversuchen gefundenen Unterschiede merklich zu klein sein.

Abb. 2. Autoradiographie eines eindimensionalen Chromatogramms; Butanol-Gemisch. Extrakt aus Blättern, die 12 min in Gegenwart von $^{32}PO_4'''$ assimiliert hatten. Von oben nach unten: UDPG und eventuell noch andere P-Verbindungen; ATP+FDP; ADP; GP; FP + AMP; PGS; AP; PEBTS

Versuche und Ergebnisse

A. Die in den Blättern gebildeten wasserlöslichen ^{32}P-Verbindungen und ihre Lage auf den Chromatogrammen

In *Helodea*-Blättern, die mit $^{32}PO_4'''$ behandelt worden waren, konnten unter Verwendung der auf S. 267 angegebenen Laufmittel und Laufmittel-Kombinationen folgende ^{32}P-Verbindungen nachgewiesen werden (Abb. 2—6):

3-Phosphoglycerinsäure (PGS).

Phosphorenolbrenztraubensäure (PEBTS).

Ribose-5-Phosphat (RiP). Die Bildung von radioaktivem RiP in *Helodea*-Blättern konnte bei den vorliegenden Versuchsbedingungen nur selten festgestellt werden. Die Mengen waren stets sehr klein.

Glucose-6-Phosphat und *Glucose-1-Phosphat* (G-6-P und G-1-P). Im allgemeinen konnten die beiden Glucose-Phosphate auch durch zweidimensionale Chromatographie nicht oder nur unvollständig voneinander getrennt werden. Aus diesem Grunde wurde stets die Summe dieser beiden Substanzen gemessen (mit GP bezeichnet). In einigen Fällen gelang es, das G-6-P vom G-1-P zu trennen. Dabei zeigte sich, daß das Mengenverhältnis G-6-P zu G-1-P unter den gewöhnlich eingehaltenen Versuchsbedingungen zwischen 2 und 3 lag.

Fructose-6-Phosphat (FP).

Fructose-1,6-Diphosphat (FDP).

Ribulose-1,5-Diphosphat (RuDP). Zu der Zeit, als die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, stand leider kein RuDP als Modellsubstanz mehr zur Verfügung. Eine kleine Menge, die Herr Prof. CALVIN (Berkeley) dankenswerterweise dem Institut überlassen hatte, war von KATING (unveröffentlicht) zur Bestimmung der Laufwerte für das Äthanol-Gemisch und das Methylglycol-Gemisch verwendet worden. Da diese

Abb. 3

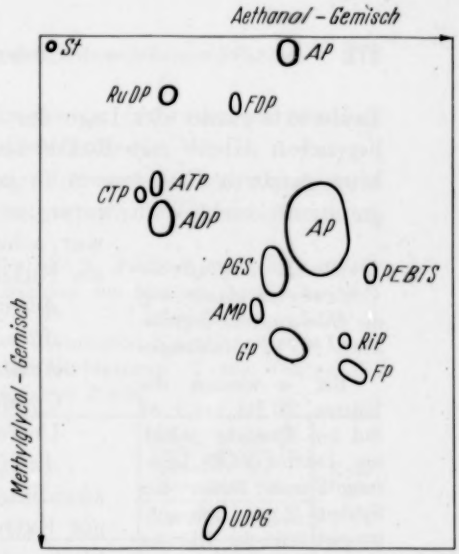


Abb. 4

Abb. 3. Autoradiographie eines zweidimensionalen Chromatogramms, das mit der Kombination A entwickelt wurde; Äthanol-Gemisch/Methylglykol-Gemisch. Extrakt aus Blättern, die 8 min in Gegenwart von $^{32}PO_4'''$ assimiliert hatten. Zur Identifizierung vgl. Abb. 4

Abb. 4. Lage der einzelnen P-Verbindungen auf dem Chromatogramm Abb. 3 und gleichartigen Chromatogrammen. Die Bezeichnungen sind aus dem voraufgegangenen Text zu entnehmen. „*St*" Startfleck

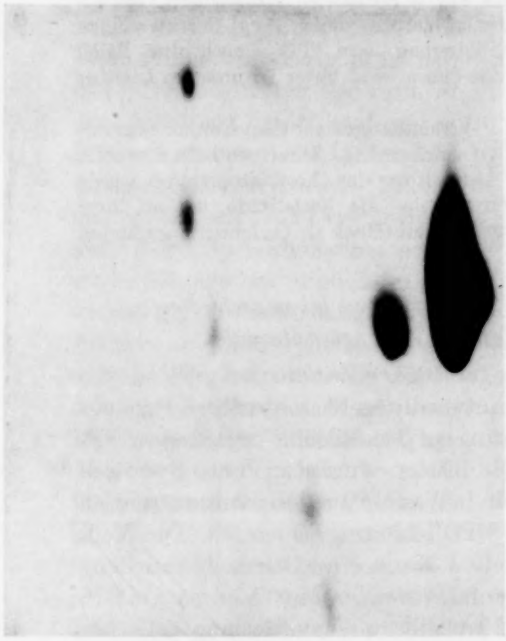


Abb. 5

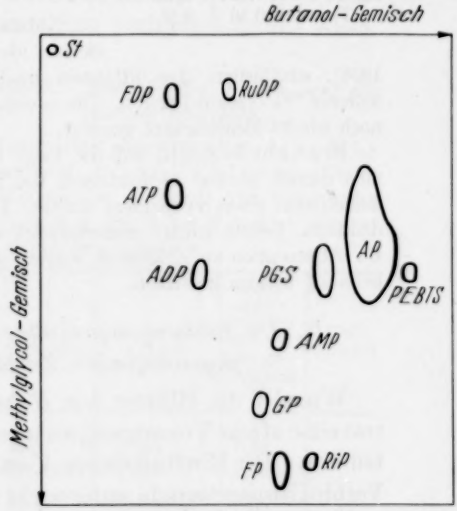


Abb. 6

Abb. 5. Autoradiographie eines zweidimensionalen Chromatogramms, das mit der Kombination B entwickelt wurde; Butanol-Gemisch/Methylglykol-Gemisch. Extrakt aus Blättern, die 4 min in Gegenwart von $^{32}PO_4'''$ assimiliert hatten. Zur Identifizierung vgl. Abb. 6

Abb. 6. Lage der einzelnen P-Verbindungen auf dem Chromatogramm Abb. 5 und gleichartigen Chromatogrammen. Bezeichnungen wie in Abb. 4

Laufwerte genau der Lage der Substanz entsprachen, die in der vorliegenden Arbeit mit RuDP bezeichnet worden ist, und da weiterhin keine anderen Substanzen in unmittelbarer Nähe auf den Chromatogrammen vorhanden waren, eine Verwechslung also ausgeschlossen war, scheint die Identifizierung dieser Substanz als RuDP gesichert zu sein.

Adenosin-5'-Triphosphat (ATP).
Adenosin-5'-Diphosphat (ADP).
Adenosin-5'-Monophosphat (AMP).
Cytidintriphosphat (CTP).
Uridindiphosphat-Glucose (UDPG).
Anorganisches Orthophosphat (AP). Bei der zweidimensionalen Auftrennung neutraler wäßriger Extrakte mit der Laufmittelkombination A blieb — in unregelmäßig wechselnden Mengen — vielfach ein kleiner Teil des AP in der zweiten Laufrichtung auf der Startgeraden liegen (vgl. Abb. 3). Diese Erscheinung trat auch bei der Chromatographierung reiner markierter Orthophosphorsäure auf; wahrscheinlich wurden die Phosphat-Anionen durch irreversible Adsorption auf dem Chromatogrammpapier festgehalten.

Tabelle 1. *Einfluß der Verdunkelungsdauer auf die Bildung von organischen* ^{32}*P-Verbindungen*

Bei a wurden die Blätter 20 Std, bei b 44 Std im Dunkeln gehalten. Dauer der Einlagerung 5 min; Dauer des Spülens 2 min; Beleuchtungsstärke der Blätter 9000 Lux, davon 8000 Lux Kunstlicht. Laufmittel-Kombination A.

Verarmung	a	b
GP . .	1,05	6,8
FP . .	0,31	2,22
ATP .	1,12	6,95
ADP .	0,56	3,2

Neben den hier aufgeführten Substanzen, die als sicher identifiziert gelten dürfen (vgl. hierzu KUES 1958), enthielten die Pflanzen nach Einlagerung von $^{32}PO_4'''$ noch eine Reihe anderer ^{32}P-Verbindungen. Die meisten von diesen sind bisher in unserem Institut noch nicht identifiziert worden.

Erwähnt sei noch, daß die Lage der P-Verbindungen auf den Chromatogrammen durch gewisse Substanzen, die in den untersuchten Zellen enthalten waren, manchmal etwas verändert wurde. Die Auswertung der Chromatogramme wurde dadurch jedoch nicht nennenswert erschwert, da die Nucleotide, die an ihrer UV-Absorption zu erkennen waren, sowie der Startfleck als Orientierungspunkte benutzt werden konnten.

B. Die Bildung organischer P-Verbindungen bei verschiedenen physiologischen Zuständen des Versuchsmaterials

Wurden die Blätter von *Helodea* für längere Zeit dunkel gehalten, so trat eine starke Verarmung an lebensnotwendigen Photosynthese-Produkten ein. Der Einfluß dieser Verarmung auf die Bildung organischer ^{32}P-Verbindungen wurde untersucht: Die Blätter wurden von den Sprossen abgezupft, 20 bzw. 44 Std im Dunkeln in Wasser aus den Kulturaquarien aufbewahrt und dann im Licht mit $^{32}PO_4'''$-Lösung behandelt. Die Meßergebnisse dieses Versuchs zeigt Tabelle 1. Nach einer Dunkelbehandlung von 44 Std (b) bildeten die Blätter von *Helodea* größere Mengen an GP, FP, ATP und ADP als nach einer 20stündigen Verdunkelung (a).

C. Die Bildung organischer P-Verbindungen im Licht und im Dunkeln (verschiedene Abtötungsverfahren)

Zunächst wurde zur Vororientierung das auf S. 266 angegebene Fällungsverfahren angewendet. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit SIMONIS und GRUBE (1952, 1953), GRUBE (1953) und QUENSELL (1957), daß von belichteten Blättern mehr organische P-Verbindungen gebildet wurden als von dunkel gehaltenen.

Zur genaueren Ermittlung der einzelnen radioaktiv markierten P-Verbindungen wurde das papierchromatographische Verfahren benutzt.

Tabelle 2. *Einfluß des Lichtes auf die Bildung von einigen organischen ^{32}P-Verbindungen*

Laufmittel-Kombination A. Dauer der Einlagerung 7 min. Dauer des Spülens 3 min.

	Mit ^{32}P markierte Verbindungen in Mol.-% des gesamten ^{32}P		Hell/Dunkel
	Hell	Dunkel	
PGS . . .	12,5	0,64	19,6
PEBTS . .	0,27	0,03	9,0
GP	4,85	0,62	7,8
FP	0,40	0,05	8,0
UDPG. . .	1,10	0,11	10,0
ATP + ADP	3,92	1,60	2,4

Die Meßergebnisse eines charakteristischen Versuches sind aus Tabelle 2 zu ersehen. Hier wurden im Licht bedeutend größere Mengen an PGS, PEBTS, Hexosephosphaten und UDPG gebildet als im Dunkeln. Die gefundenen Hell-Dunkel-Unterschiede waren bei PGS besonders groß. Mit Abstand folgten UDPG, PEBTS, GP und FP. Die Hell-Dunkel-Unterschiede der Nucleotide waren nur verhältnismäßig klein.

Da nun KANDLER (1957) die Vermutung ausgesprochen hat, daß PGS möglicherweise erst bei der Abtötung mit kochendem Äthanol aus einem instabilen Zwischenprodukt entstehen könnte und somit nicht als Zwischenprodukt der CO_2-Assimilation anzusehen sei, und da möglicherweise auch *andere* P-Verbindungen unter Bildung von Abbauprodukten von dem kochenden Äthanol verändert werden könnten, wurde auch 10%ige wäßrige TES-Lösung zur Abtötung der Blätter benutzt. Die Meßergebnisse für PGS sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. *Einfluß des Lichtes auf die Bildung von PGS*

Laufmittel-Kombination A. Abtötungsmittel: 10%ige TES-Lösung (Dauer der Extraktion: 20 min) oder kochender Äthylalkohol. Die TES-Extrakte wurden hier nicht neutralisiert.

Probe Nr.	Lichtverhältnisse	Abtötungsmittel	Radioaktive PGS in Mol.-% des gesamten ^{32}P	Hell/Dunkel
1	Hell	TES	0,92	28
2	Dunkel	TES	0,033	
3	Hell	Alkohol	0,98	24
4	Dunkel	Alkohol	0,041	

Zwei Chromatogramme, die von einem weiteren Versuch mit TES als Abtötungsmittel stammen, sind in den Abb. 7 und 8 wiedergegeben. Hier zeigen sich deutliche Hell-Dunkel-Unterschiede bei PGS, PEBTS,

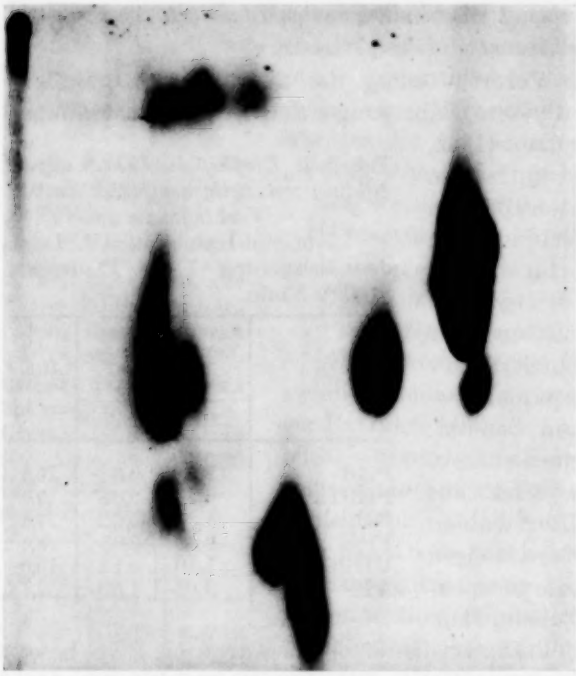


Abb. 7

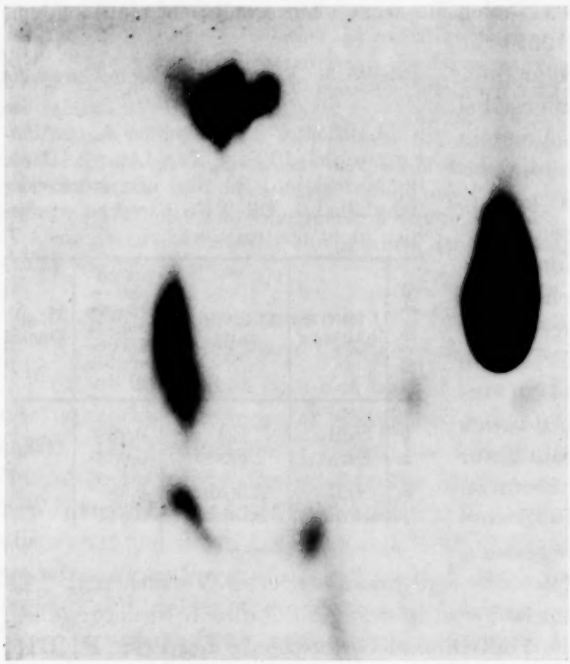


Abb. 8

GP und FP. Die *Abtötung* der Blätter mit *TES-Lösung* ergab also, ebenso wie die Abtötung mit kochendem Äthanol, daß *im Licht bedeutend mehr PGS*, PEBTS, GP und FP gebildet wurde *als im Dunkeln*.

In einem weiteren Versuch wurden die Blätter nach der Einlagerung zum Abtöten entweder (a) 2 min mit Äthanol gekocht, dann 60 min in 8 ml 86%igem Äthanol von —20° C aufbewahrt oder aber (b) 60 min in 8 ml 86%igen Äthanol von —20° C gegeben oder (c) 60 min mit 8 ml 90%igem Aceton von —20° C behandelt. Anschließend wurde 3 Std lang mit destilliertem Wasser (2 ml je Probe) von +7° C extrahiert.

Die Meßergebnisse dieses Versuchs

Abb. 7. Autoradiographie eines zweidimensionalen Chromatogramms. Laufmittelkombination B. 10 min Photosynthese (stationäre Phase) in Gegenwart von $^{32}PO_4'''$. Abtötung mit TES. Zur Lage der einzelnen P-Verbindungen vgl. Abb. 6

Abb. 8. Wie Abb. 7, aber Dunkel-Versuch von 10 min Dauer

sind aus Tabelle 4 zu ersehen. Bei Abtötung mit 86%igem Äthanol oder 90%igem Aceton von —20° C ergab sich, ebenso wie bei der Abtötung mit kochendem Äthanol, daß im Licht bedeutend größere Mengen an PGS, GP, FP und FDP gebildet wurden als im Dunkeln.

D. Die Bildung organischer P-Verbindungen im Licht und im Dunkeln bei verschiedener Versuchsdauer

In den bisherigen Versuchen betrug die Versuchsdauer stets einige Minuten. Da hierbei die Möglichkeit bestand, daß gewisse, nur kurzzeitig radioaktiv markierte P-Verbindungen verborgen blieben, wurden ausgedehnte Versuche von verschiedener Dauer durchgeführt.

Da sich, wie schon auf S. 269 festgestellt wurde, das Verhältnis ^{32}P-Verbindung zu ^{31}P-Verbindung für jede Substanz dauernd änderte, dürfen hier die gemessenen Radioaktivitäten und die daraus berechneten Mol-Prozente nur bei einer Betrachtung der Hell-Dunkel-Unterschiede, nicht aber bei einer Betrachtung der Zeitabhängigkeit als ungefähres Maß für die während des Versuchs gebildeten Mengen an ^{31}P-Verbindungen herangezogen werden.

Tabelle 4. *Einfluß des Lichtes auf die Bildung einiger organischer ^{32}P-Verbindungen*

Verschiedene Abtötungsmethoden: a, b und c, vgl. Text. Radioaktivität der Einlagerungslösung 0,42 mC/10 ml, Dauer der Einlagerung 75 sec, Dauer des Spülens 75 sec. Laufmittel-Kombination A. H = Hell; D = Dunkel.

Lichtverhältnisse	Abtötung	Mit ^{32}P markierte Verbindungen in Mol.-% des gesamten ^{32}P			
		PGS	GP	FP	FDP
H	a	17,3	5,1	2,6	2,6
D	a	0	0,74	0	0
H	b	14,0	6,4	1,65	1,6
D	b	0	0,86	0,09	0
H	c	20,6	6,4	2,94	3,5
D	c	0	0,97	0	0

In dem folgenden, ausführlicher dargestellten Versuch betrug die Radioaktivität der Einlagerungslösung 2,3 mC/10 ml und das Volumen der Lösung 5 ml. Als Dauer des Eintauchens der Blätter in die aktive Lösung wurde in allen Einzelversuchen eine Zeit von 10 sec gewählt. Ebensolang war die Spülzeit. Variiert wurde die Zeit bis zum Abtöten. Die Beleuchtungsstärke betrug 5200 Lux; davon waren 5000 Lux Kunstlicht.

Die Einlagerung wurde in Bechergläsern von 25 ml Inhalt vorgenommen. Hierbei lagen die Blätter in kleinen Glaseinsätzen (vgl. S. 264). Die gewonnenen Meßwerte wurden wie üblich auf das gesamte wasserlösliche ^{32}P bezogen. Eine Ausnahme bildeten diejenigen Proben, die nach der 10 sec dauernden Einlagerung *nicht* gespült, sondern *gleich* abgetötet wurden. Da die Blätter hierbei nicht von anhaftender $^{32}PO_4'''$-Lösung befreit worden waren, hätte das Beziehen der Meßwerte auf das gesamte ^{32}P dieser Proben zu einer starken Verfälschung des Ergebnisses geführt. Aus diesem Grund wurden hier die Meßwerte auf den Mittelwert des gesamten ^{32}P der übrigen Proben bezogen.

Die mit der Laufmittel-Kombination B gefundene Zeitabhängigkeit der Bildung organischer ^{32}P-Verbindungen ist in Abb. 9 (Hellproben) und Abb. 10 (Dunkelproben) dargestellt. Mit dem Wort „Zeit" ist hier die Versuchsdauer vom Beginn der Einlagerung bis zur Abtötung

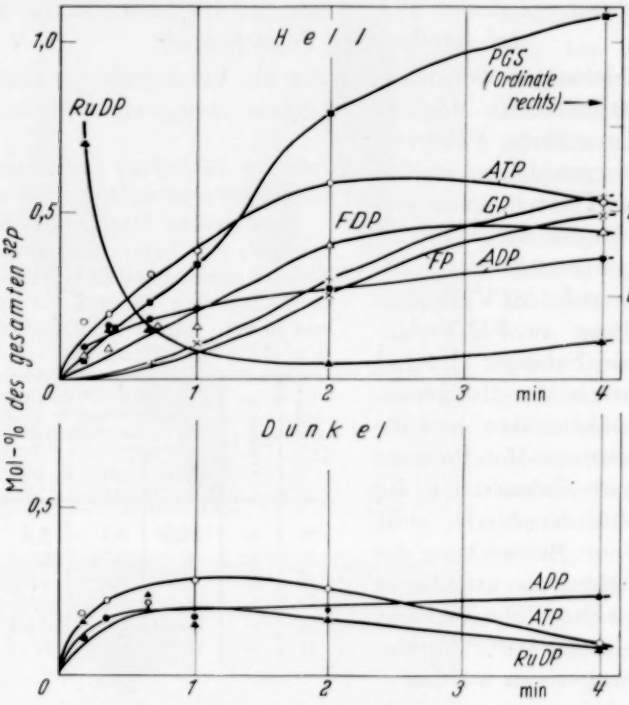


Abb. 9

Abb. 10

Abb. 9. Die Bildung organischer ^{32}P-Verbindungen in Abhängigkeit von der Zeit (Hell-Proben). Laufmittel-Kombination B

Abb. 10. Die Bildung organischer ^{32}P-Verbindungen in Abhängigkeit von der Zeit (Dunkel-Proben). Laufmittel-Kombination B. Die Mengen an FDP, FP und GP waren stets kleiner als 0,03 Mol.-%

gemeint. Die mit der Laufmittel-Kombination A gewonnenen Zeitfunktionen sind nicht abgebildet, weil sie denselben Verlauf zeigten wie die Kurven der Abb. 9 und 10; diese entsprechen übrigens den Ergebnissen eines weiteren Versuches, bei dem die Blätter mit TES-Lösung abgetötet wurden. Die in den TES-Extrakten enthaltenen ^{32}P-Verbindungen wurden hierbei durch Fällung mit Bleiacetat von der TES-Lösung abgetrennt und anschließend mit Kationen-Austauscher in der H-Form (Dowex 50) wieder in Lösung gebracht.

Die Abb. 11 und 12 zeigen Autoradiographien zweidimensionaler Chromatogramme von Blattextrakten nach 10 sec Photosynthese bzw.

nach 10 sec Dunkelheit. Eine weitere Autoradiographie (Hellprobe, 4 min Photosynthese) ist bereits in Abb. 5 dargestellt.

Es interessieren nun zunächst die bei den verschiedenen Einlagerungszeiten festgestellten Hell-Dunkel-Unterschiede. Wieder ist die Markierung von PGS im Licht besonders stark (in Abb. 9 ist für PGS ein anderer Maßstab gewählt!). Auch sonst wurden die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche bestätigt. Außerdem zeigen sich aber für RuDP, besonders bei einer Versuchsdauer von 10 sec, sehr große Hell-Dunkel-Unterschiede. RuDP ist bei 10 sec Photosynthese die am stärksten markierte P-Verbindung. Schließlich sind auch für ATP, besonders bei einer Versuchsdauer von 2—4 min, Licht-Dunkel-Unterschiede zu erkennen. Wieweit man aus diesen Zeit-Kurven die Reihenfolge ermitteln kann, in der die

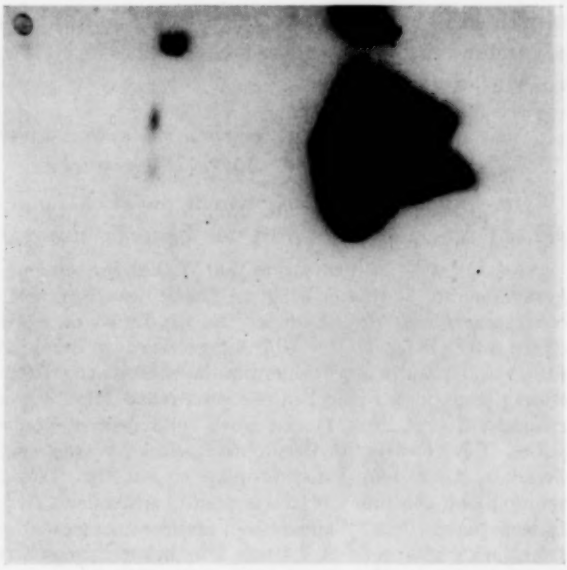


Abb. 11. Autoradiographie eines zweidimensionalen Chromatogramms. Laufmittel-Kombination A. 10 sec Photosynthese in Gegenwart von $^{32}PO_4'''$. Gegenüber Dunkelversuch (vgl. Abb. 12) ist RuDP zusätzlich markiert. Zur Lage der einzelnen P-Verbindungen vgl. Abb. 4

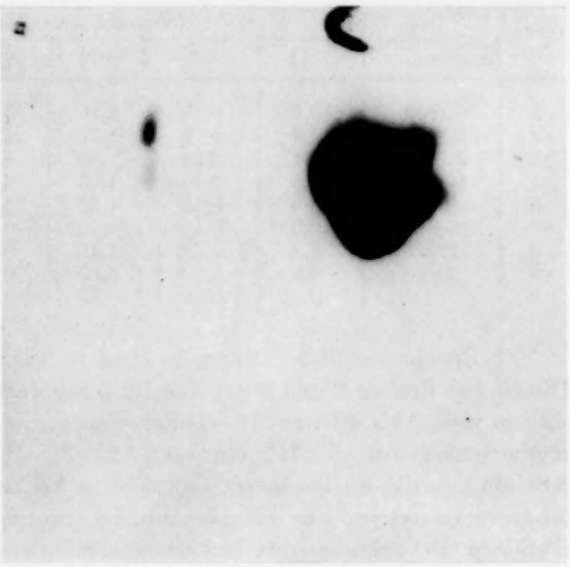


Abb. 12. Wie Abb. 11, aber Dunkel-Versuch von 10 sec Dauer

einzelnen P-Verbindungen bei der CO_2-Assimilation als Zwischenprodukte auftreten, wird an anderer Stelle erörtert [WEICHART (1) 1959, sowie in Vorbereitung].

E. Die Bildung organischer P-Verbindungen bei verschiedenen Beleuchtungsstärken

Im folgenden Versuch wurde die Abhängigkeit der Bildung organischer P-Verbindungen von der Beleuchtungsstärke ermittelt.

Als Lichtquelle diente eine 500 W-Glühfadenlampe, die sich in einem wassergekühlten Metallmantel befand. Dieser besaß an seiner senkrechten Seitenwand eine kreisrunde Öffnung, durch die das Licht nach außen gelangen konnte. Die divergenten Strahlen der Glühlampe wurden durch einen Kondensor zu einem annähernd parallelen Strahlenbündel zusammengefaßt. Dieses wurde durch einen schräg stehenden Spiegel in die senkrechte Richtung umgelenkt, da das Einlagerungsgefäß (vgl. Abb. 1), wie auch sonst immer, von unten her belichtet werden sollte. Die gewünschte Beleuchtungsstärke wurde durch Variieren des Abstandes zwischen Lichtquelle und Objekt eingestellt. Die Lichtintensität der Lampe wurde nicht verändert, weil die damit verbundene Temperaturänderung des Glühfadens (nach dem Wienschen Verschiebungsgesetz) zu einer Veränderung des Lichtspektrums geführt hätte. Die Beleuchtungsstärke war während der Vorbelichtung stets ebensogroß wie bei der Einlagerung und Spülung.

Tabelle 5. *Einfluß verschiedener Beleuchtungsstärken auf die Bildung organischer ^{32}P-Verbindungen*

Laufmittel-Kombination A. Zu den Proben 2 und 9 gehören die Abb. 13 und 14. Zu Probe 6 gehört Abb. 3. Dauer der Einlagerung 5 min. Dauer des Spülens 3 min.

Probe Nr.	Beleuchtungsstärke (Lux)	^{32}P-Verbindungen in Mol.-% des gesamten ^{32}P					
		PGS	GP	FP	FDP	ATP	ADP
1	40000	13,2	5,25	1,80	1,80	1,80	3,00
2	40000	11,4	4,75	1,70	1,90	1,65	3,65
3	20000	13,3	5,00	1,90	1,45	2,70	2,10
4	10000	14,5	5,10	1,75	1,20	2,25	3,35
5	7000	13,0	5,40	1,85	1,35	2,55	3,20
6	4000	10,2	5,45	1,70	0,82	1,70	3,75
7	2000	8,8	4,40	1,40	0,65	2,95	2,50
8	2000	9,0	5,20	1,65	0,45	1,55	3,45
9	0	0,21	0,66	0,28	0,0	1,90	3,10

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die zu den Proben 2 und 9 der Tabelle 5 gehörenden Autoradiographien sind in den Abb. 13 und 14 wiedergegeben, die zu Probe 6 gehörende wurde bereits auf S. 271 gebracht (Abb. 3). Bei einem Vergleich der Abbildungen ist zu beachten, daß Abb. 3 bei der Reproduktion etwas länger belichtet worden ist als Abb. 13, weil in Abb. 3 die Lage der einzelnen P-Verbindungen besonders deutlich sichtbar werden sollte.

Im Bereich zwischen 0 und 2000 Lux zeigte die Bildung von PGS, GP, FP und FDP eine starke Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke.

Eine Erhöhung auf 4000 Lux bewirkte bei PGS und FDP eine weitere ziemlich starke, bei GP und FP dagegen nur noch eine kleine Erhöhung der neu gebildeten Substanzmengen. Während für GP und FP bei 4000 Lux bereits Lichtsättigung erreicht war, stiegen die PGS- und FDP-Mengen auch oberhalb von 4000 Lux mit zunehmender Beleuchtungsstärke noch etwas an. Die Lichtsättigung wird also für die verschiedenen P-Verbindungen bei *verschiedener* Beleuchtungsstärke erreicht.

Die Markierung der Nucleotide zeigte

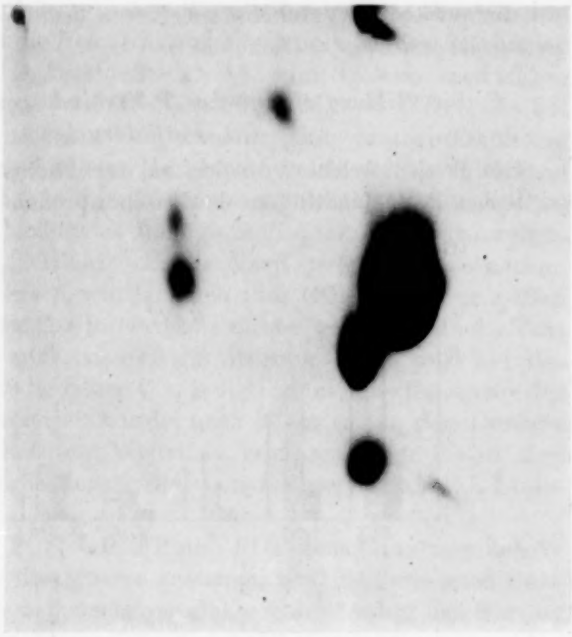


Abb. 13

Abb. 13. Autoradiographie eines zweidimensionalen Chromatogramms. Laufmittel-Kombination A. 8 min Photosynthese in Gegenwart von $^{32}PO_4'''$; Beleuchtungsstärke 40 000 Lux. Probe 2 der Tabelle 5 (gegenüber Dunkel-Versuch, vgl. Abb. 14, zusätzliche markierte Flecken). Über die Lage der einzelnen P-Verbindungen vgl. Abb. 4

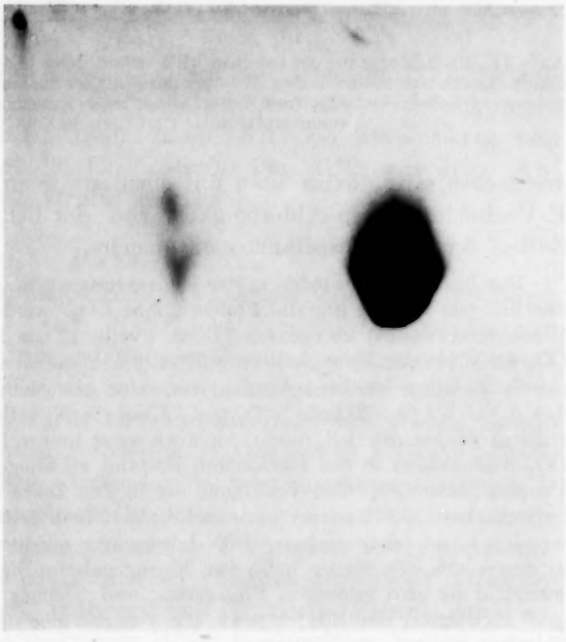


Abb. 14

Abb. 14. Autoradiographie eines zweidimensionalen Chromatogramms. Laufmittel-Kombination A. Dunkel-Versuch von 8 min Dauer in Gegenwart von $^{32}PO_4'''$. Probe 9 der Tabelle 5

bei der gewählten Versuchsdauer *keine deutliche Abhängigkeit* von der *Beleuchtungsstärke* (s. Diskussion).

F. Die Bildung organischer P-Verbindungen bei verschiedenen CO_2-Partialdrucken

Die Frage, welche von den an der Photosynthese beteiligten organischen P-Verbindungen als Zwischenprodukte der *CO_2-Assimilation*

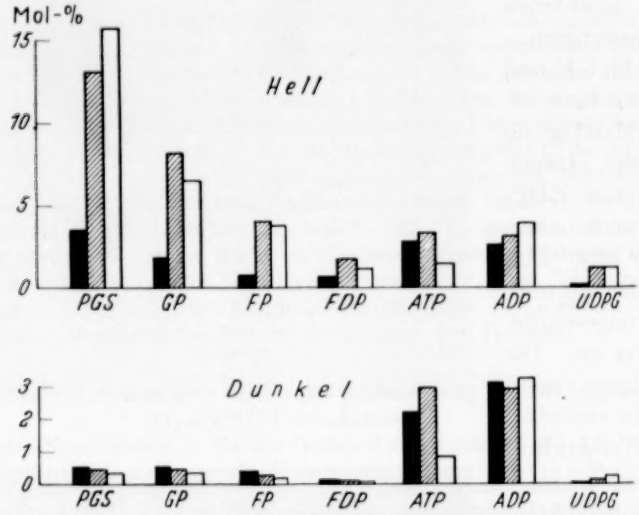


Abb. 15. Die Bildung von organischen ^{32}P-Verbindungen in Abhängigkeit vom CO_2-Partialdruck. Laufmittel-Kombination A. Dauer der Einlagerung 4 min, Dauer des Spülens 1,5 min. Schwarze Kolumnen: CO_2-freie Luft; schraffierte Kolumnen: Luft (0,03 Vol.-% CO_2); weiße Kolumnen: Carbogen (5 Vol.-% CO_2)

anzusehen sind, kann man entscheiden, wenn man die Bildung der P-Verbindungen in Abhängigkeit von der CO_2-Konzentration in den Zellen der Versuchspflanzen untersucht.

Die Blattproben wurden in der Einlagerungsapparatur (Abb. 1) mit je 13,5 ml destilliertem Wasser (für die Proben „ohne CO_2" wurde ausgekochtes destilliertes Wasser verwendet) übergossen. Dann wurde 10 min lang Gas von bestimmtem CO_2-Gehalt in die Flüssigkeit eingeleitet, und zwar entweder Luft, aus der das CO_2 durch Kalilauge entfernt worden war, oder gewöhnliche Luft oder „Carbogen", das 5 Vol-% CO_2, 20 Vol.-% O_2 und 75 Vol.-% N_2 enthielt. Während der Durchgasung wurden die Hellproben, wie auch sonst immer, 10 min vorbelichtet, um die CO_2-Assimilation in den stationären Zustand zu bringen und gleichzeitig bei den Proben „ohne CO_2" den Verbrauch der in den Zellen und in den Intercellularen befindlichen CO_2-Reserven herbeizuführen. Nach Beendigung der Vorbelichtung wurden 1,5 ml einer starken $^{32}PO_4'''$-Lösung (0,8 mC/10 ml) zu den 13,5 ml Wasser, in denen sich die Blätter befanden, hinzugegeben. Die Durchgasung wurde auch während der nun folgenden Einlagerung und Spülung fortgesetzt. Die Abtötung und Extraktion der Blätter sowie die Verarbeitung der Extrakte wurden in der üblichen Weise vorgenommen.

Abb. 15 zeigt die Meßergebnisse dieses Versuches. Wurden die Lösungen, in denen sich die *Helodea*-Blätter befanden, unter Belichtung mit Luft durchgast (CO_2-Partialdruck: 0,23 mm Hg), so entstanden bedeutend größere Mengen an PGS, GP, FP, FDP und UDPG als bei Durchgasung mit Luft, die *kein* CO_2 enthielt. Eine weitere Erhöhung des CO_2-Partialdruckes auf 38 mm Hg brachte keine weitere Erhöhung der Substanzmengen. Die in den Blättern enthaltene *Gesamtmenge* an wasserlöslichen ^{32}P-Verbindungen (anorganisch plus organisch) zeigte mit zunehmendem CO_2-Partialdruck nur einen *geringfügigen* Anstieg. Wie man aus Abb. 15 erkennt, wurden auch ohne CO_2-Zufuhr von außen kleine Mengen P-haltiger Assimilationsprodukte gebildet. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, daß die Atmung, die ja auch bei Belichtung weiterläuft, ständig neues CO_2 lieferte, und daß dieses von der CO_2-Assimilation aufgenommen wurde, noch bevor es aus dem Gewebe ausgeschieden werden konnte. Weiterhin kommen auch die in den Zellen gegebenenfalls vorhandenen Bicarbonat-Reserven als CO_2-Lieferanten in Frage.

Im Dunkeln zeigten PGS, GP, FP und FDP genau das umgekehrte Verhalten wie im Licht. Das war zu erwarten, weil die genannten Substanzen im Dunkeln nur als Zwischenprodukte von Atmung und Gärung auftreten, und weil diese Prozesse, bei denen CO_2 entsteht, um so unbehinderter ablaufen können, je weniger CO_2 sich in den Zellen befindet. Im Dunkeln *hemmt* also höherer CO_2-Partialdruck die Bildung ^{32}P-markierter Intermediärprodukte.

Die Bildung von radioaktivem ATP blieb bei steigendem CO_2-Partialdruck im Hellen und im Dunkeln erst annähernd konstant (Schwankungen innerhalb der Fehlergrenze), nahm dann aber, bei Verwendung von Carbogen, stark ab (vgl. die Diskussion). Bei ADP war keine Abhängigkeit vom CO_2-Partialdruck zu erkennen.

Diskussion

Die einzelnen Reaktionsschritte der CO_2-Assimilation sind besonders von Calvin, Benson u. Mitarb. untersucht worden. Das von Calvin [(1956) (1) und (2)] auf Grund vielfältiger Versuche angegebene Schema der CO_2-Assimilation erklärt die meisten bisherigen Beobachtungen in befriedigender Weise. Trotzdem darf es noch keineswegs in allen Einzelheiten als gesichert angesehen werden (z. B. Gibbs und Kandler 1957; Kandler und Gibbs 1959). Außerdem besteht durchaus die Möglichkeit, daß bei anderen Versuchsobjekten als den von Calvin, Benson u. Mitarb. benutzten, zum mindesten einige Teilprozesse der CO_2-Assimilation anders, als es dem Calvinschen Schema entspricht, ablaufen könnten (Mortimer 1958). Während nun Calvin u. Mitarb. ihre Versuche vorwiegend mit radioaktivem $^{14}CO_2$ durchgeführt haben, wurde

in der vorliegenden Arbeit, im Zusammenhang mit Versuchen zur Aufklärung der lichtabhängigen Phosphorylierung, radioaktives *Phosphat* ($^{32}PO_4'''$) benutzt. Hierbei können über solche Photosynthese-Produkte, die kein P enthalten, naturgemäß keine Aussagen gemacht werden. So muß beispielsweise offengelassen werden, ob als primärer Acceptor des für die CO_2-Assimilation benötigten Kohlendioxyds möglicherweise eine Substanz dient, die kein P enthält (vgl. METZNER, SIMON, METZNER und CALVIN 1957; METZNER, SIMON und METZNER 1958). In diesem Fall würde das CO_2 erst sekundär auf Ribulose-Diphosphat übertragen werden. Weiterhin ist es bei Anwendung von radioaktivem Phosphat nicht möglich, die Endprodukte der CO_2-Assimilation, wie Glucose, Fructose, Rohrzucker, Stärke usw., zu erfassen. Schließlich kann auch die Verarbeitung von Photosyntheseprodukten zu Amino- und Carbonsäuren nicht untersucht werden. Auf der anderen Seite bietet aber das $^{32}PO_4'''$ gegenüber dem $^{14}CO_2$ auch gewisse Vorteile, da auf diese Weise *der Weg des Phosphors* bei der Bildung der intermediären Photosyntheseprodukte verfolgt und deren Zusammenhang mit der Photosynthese-Phosphorylierung untersucht werden kann.

Nach dem von CALVIN angegebenen Schema müßten bei Verwendung von $^{32}PO_4'''$ folgende Zwischenprodukte der CO_2-Assimilation radioaktiv markiert werden:

Ribulose-1,5-Diphosphat (RuDP), 3-Phosphoglycerinsäure (PGS), 3-Phosphoglycerinaldehyd, Dioxyacetonphosphat, Fructose-1,6-Diphosphat (FDP), Fructose-1-Phosphat, Fructose-6-Phosphat (FP), Glucose-1- und -6-Phosphat (GP), Uridindiphosphat-Glucose (UDPG), Saccharosephosphat, Seduheptulose-1,7-Diphosphat, Seduheptulose-7-Phosphat, Ribose-5-Phosphat, Ribulose-5-Phosphat.

Weiterhin müßten auch Adenosintriphosphat (ATP) und Phosphorenolbrenztraubensäure (PEBTS) radioaktiv markiert werden, weil nach CALVIN auch diese Substanzen, obgleich sie *nicht* zu den *Zwischenprodukten* gehören, an der CO_2-Assimilation beteiligt sind. Die Meß-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß von belichteten *Helodea*-Blättern *bedeutend* größere Mengen an PGS, PEBTS, FDP, FP, GP und UDGP gebildet wurden als von dunkel gehaltenen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der von GRUBE (1953) bei *Helodea densa* gefundenen, durch Licht erhöhten Bildung von Verbindungen der TES-löslichen organischen Phosphatfraktion, die auch von QUENSELL (1957) an *Helodea crispa* bestätigt werden konnte. Kürzlich untersuchte auch BRADLEY (1957) bei *Scenedesmus* die bei Belichtung bzw. Verdunkelung auftretenden Mengenveränderungen der P-Verbindungen nach einstündiger Inkorporation mit ^{32}P. Dabei wurde angenommen, daß bereits nach 1 Std eine weitgehende Gleichverteilung des ^{32}P mit dem ^{31}P in den fraglichen P-Verbindungen eingetreten ist. Aus den Aktivitätsmessungen

der markierten P-Verbindungen ergaben sich bei PGS, PEBTS, GP, RuDP sowie ATP + ADP mehr oder weniger große Spiegelschwankungen, die sich ebenfalls auf Grund des Schemas von CALVIN deuten lassen. Nach unseren Erfahrungen an *Helodea* und *Ankistrodesmus* ist allerdings die benutzte Inkorporationszeit für eine Gleichverteilung des ^{32}P noch nicht ausreichend. Wir kommen an anderer Stelle darauf zurück (SIMONIS u. Mitarb., unveröffentlicht).

Da bei meinen Versuchen nur ein kleiner Bruchteil der bei den oben aufgeführten Substanzen gefundenen Hell-Dunkel-Unterschiede durch die photosensibilisierte Phosphorylierung erklärt werden kann und da weiterhin die von einer im Licht verstärkten $^{32}PO_4'''$-Aufnahme hervorgerufene Erhöhung der radioaktiven Markierung der P-Verbindungen durch das Beziehen der Meßwerte auf das gesamte lösliche ^{32}P eliminiert wurde, ergibt sich zunächst, daß PGS, PEBTS, FDP, FP, GP und UDPG an der Photosynthese von *Helodea* beteiligt sind. Besonders bemerkenswert erscheint die Tatsache, daß die *verschiedenen*, hier benutzten *Abtötungsverfahren* stets die gleichen Ergebnisse lieferten. Daher kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Ergebnisse auf die spezifische Wirkung eines bestimmten Abtötungsmittels zurückzuführen sind (vgl. KANDLER 1957; SIMONIS, KATING und KUES 1957; SIMONIS und WEICHART 1958).

Aus den Versuchen von verschiedener Dauer ist weiter zu ersehen, daß auch RuDP für bestimmte Versuchszeiten große Hell-Dunkel-Unterschiede aufweist. Besonders einige Sekunden nach Beginn der $^{32}PO_4'''$-Einlagerung besitzt die Hell-Kurve von RuDP bedeutend größere Werte als die Dunkel-Kurve. RuDP ist bei einer Einlagerungsdauer von 10 sec im Licht sogar die am stärksten markierte organische P-Verbindung. Hieraus ergibt sich, daß auch RuDP an der Photosynthese von *Helodea* beteiligt ist.

Bei ATP liegen die größten Hell-Dunkel-Unterschiede zwischen 2 und 4 min vor. Die Tatsache, daß hier im Licht trotz erhöhten ATP-Verbrauchs die Radioaktivität des ATP größer ist als im Dunkeln, darf als Beweis dafür angesehen werden, daß die Bildungsgeschwindigkeit des ATP durch die Wirkung des Lichtes *stark vergrößert* wird (vgl. die Erläuterungen auf S. 284).

Der Versuch über die *Abhängigkeit* der Bildung organischer P-Verbindungen von der *Beleuchtungsstärke* (vgl. S. 278 ff.) zeigt den Zusammenhang zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese sehr deutlich. Die Markierung von PGS, FDP, FP und GP weist bei kleinen Beleuchtungsstärken eine sehr starke, bei größeren nur noch eine kleine bzw. gar keine Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke auf. Die *Lichtsättigung* wird z. T. bei geringer Beleuchtungsstärke, z. T. aber erst bei viel höherer Beleuchtungsstärke erreicht. Diese auffällige Tatsache läßt sich noch

nicht deuten. Betrachtet man nämlich die obengenannten P-Verbindungen als Glieder einer Reaktionskette (CO_2-Assimilation), die, je nach der Beleuchtungsstärke, verschieden schnell abläuft, so müßte die Bildung *aller* Zwischenprodukte durch die Reaktionsgeschwindigkeit dieser, im stationären Zustand befindlichen Kette im gleichen Maße beeinflußt werden. Es wäre denkbar, daß noch Seiten-Reaktionen, wie insbesondere der Calvin-Cyclus und der Pentose-Cyclus, mit hineinspielen. Hier müssen weitere Versuche Klarheit bringen.

Die Markierung des ATP zeigt bei der gewählten Einlagerungszeit *keine* Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke. Nun ist ATP (s. unten) kein Zwischenprodukt der CO_2-Assimilation, vielmehr tritt es nur von außen her, als Phosphat- und Energieüberträger, mit der CO_2-Assimilationskette in Reaktion. Aus diesem Grunde brauchen hier die stationär vorhandenen Substanzmengen nicht — wie das bei den Zwischenprodukten der CO_2-Assimilation der Fall ist — mit zunehmender Reaktionsgeschwindigkeit anzusteigen; vielmehr können sie verschiedene Werte annehmen. Wird beispielsweise der Verbrauch an ATP extrem groß, so könnte *trotz großer Bildungsgeschwindigkeit* die stationär vorhandene Substanzmenge und damit auch die gemessene Radioaktivität praktisch gleich Null werden. Zudem braucht das gesamte Reservoir einer solchen Substanz wegen ihres Vorkommens an verschiedenen Zellorten überhaupt *nicht nur an einer* bestimmten Reaktion beteiligt zu sein. Hieraus wird deutlich, daß bei Substanzen, die *nicht* als *Zwischenprodukte* einer Reaktionskette auftreten, die gemessenen Radioaktivitäten kein Maß für ihre Bildungsgeschwindigkeit und damit für die innerhalb einer bestimmten Versuchszeit gebildeten Mengen sind. Eine eindeutige Aussage ist nur in Ausnahmefällen möglich (vgl. S. 282 und 285).

Die Frage, welche von den an der Photosynthese von *Helodea* beteiligten P-Verbindungen als Zwischenprodukte der *CO_2-Assimilation* anzusehen sind, ließ sich durch die Untersuchung der Bildung organischer P-Verbindungen in Abhängigkeit von der CO_2-Konzentration beantworten. Danach sind wenigstens PGS, FDP, FP, GP und UDPG als Zwischenprodukte der CO_2-Assimilation anzusehen. Über RuDP können auf Grund des hier mitgeteilten Versuchs in dieser Beziehung keine Aussagen gemacht werden, weil dieses bei der gewählten Versuchsdauer (5,5 min) sowohl in Anwesenheit als auch bei Abwesenheit von CO_2 nur noch sehr schwach radioaktiv markiert war. Nun konnten aber CALVIN u. Mitarb. (1956) beobachten, daß bei plötzlichem CO_2-Entzug die stationär vorhandene Menge an RuDP stark anstieg, weil die Reaktion RuDP + $CO_2 \rightarrow$ 2 PGS gehemmt wurde. BRADLEY fand, daß bei hohen CO_2-Konzentrationen das RuDP völlig verschwand. Da die übrigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit dem CO_2-Assimilationscyclus von CALVIN in Einklang stehen, und vor allem, da auch in meinen Versuchen RuDP

nach 10 sec ^{32}P-Einlagerung im Licht die am stärksten markierte Verbindung darstellt, ist anzunehmen, daß RuDP *auch bei Helodea* als *Zwischenprodukt* der *CO_2-Assimilation* zu betrachten ist. Ein mit ^{32}P zu führender Beweis hierfür muß allerdings erst noch erbracht werden.

Die Bildung von radioaktivem Adenosintriphosphat zeigt bei einem Anstieg des CO_2-Partialdruckes von etwa 0 auf 0,23 mm Hg *keine* Abhängigkeit von der CO_2-Konzentration. Hieraus kann man den Schluß ziehen, daß ATP *nicht* zu den Zwischenprodukten der CO_2-Assimilation gehört. Indessen kann man aus diesem experimentellen Ergebnis noch nicht folgern, daß die Bildungsgeschwindigkeit des ATP vom CO_2-Partialdruck unabhängig ist, weil eine verstärkte Bildung von radioaktiv markiertem ATP durch eine Verkleinerung der stationär vorhandenen ATP-Menge (infolge des erhöhten ATP-Verbrauchs in CO_2-Gegenwart) kompensiert werden kann.

Die bei einer weiteren Erhöhung des CO_2-Partialdruckes von 0,23 mm Hg auf 38 mm Hg beobachtete *Abnahme* der ATP-Radioaktivität ist auf eine verringerte ATP-Bildung zurückzuführen (der ATP-*Verbrauch* ist in diesem Bereich annähernd *konstant*). Diese Erscheinung dürfte vielleicht dadurch zu erklären sein, daß ein Teil des ATP durch oxydative Phosphorylierung entsteht, die offenbar *durch CO_2 gehemmt* wird, weil sie mit Reaktionen verknüpft ist, bei denen CO_2 frei wird.

Da die durch den hohen CO_2-Partialdruck (38 mm Hg) hervorgerufene Hemmung der Bildung von ATP im Licht schwächer ist als im Dunkeln, darf man annehmen, daß bei *Helodea* nicht nur durch die auch im Dunkeln ablaufende oxydative Phosphorylierung und die Substratphosphorylierung, sondern *auch durch Photosynthese-Phosphorylierung* ATP entstehen kann.

Die experimentellen Befunde der CO_2-Abhängigkeit der ^{32}P-Markierung stehen im übrigen mit den Versuchen von GRUBE (1953) an *Helodea* im Einklang, der im Licht bei Gegenwart von CO_2 eine wesentlich erhöhte Bildung des TES-löslichen organischen Phosphats gegenüber den CO_2-Mangelversuchen fand. Die Hell-Dunkel-Unterschiede des TES-löslichen organischen Phosphats waren bei den Versuchen „mit CO_2" am größten, bei denen „ohne CO_2" aber auch verhältnismäßig groß. Aus diesem Grunde vermutete GRUBE einen „Zusammenhang des Phosphatstoffwechsels mit dem unabhängig von der CO_2-Aufnahme verlaufenden Anteil der Photosynthese". Diese Vermutung konnte in Übereinstimmung mit STREHLER (1953) von mir bestätigt werden, indem die Bildung großer Mengen an ATP und ADP im Licht *auch in Abwesenheit von CO_2* beobachtet wurde.

Zum Schluß sei noch die Frage beantwortet, warum in der vorliegenden Arbeit nur ein Teil von den zu erwartenden P-haltigen Photo-

synthese-Produkten gefunden wurde. Hierzu ist einmal zu sagen, daß es offensichtlich auch BENSON, CALVIN u. Mitarb. bisher noch nicht gelungen ist, die Beteiligung *aller* dieser P-Verbindungen an der Photosynthese eindeutig zu beweisen. Weiterhin ist auffällig, daß insbesondere diejenigen P-Verbindungen, die im *Calvin*-Cyclus *vor* dem RuDP stehen, nicht radioaktiv markiert wurden, z. B. Ribulose-5-Phosphat, Seduheptulose-7-Phosphat und Seduheptulose-1,7-Diphosphat. Da diese Substanzen bei $^{32}PO_4'''$-Zugabe von allen am *Calvin*-Cyclus beteiligten als letzte radioaktiv markiert werden, kann es sein, daß das ^{32}P bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit noch nicht soweit vorgedrungen war. Ferner könnte man — wie schon oben erwähnt — vermuten, daß die Photosynthese (und speziell die CO_2-Assimilation) von *Helodea* zum mindesten teilweise anders verläuft als bei den von CALVIN untersuchten Objekten. Dies ist indessen nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sehr unwahrscheinlich. Dagegen dürfte es durchaus möglich sein, daß die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Teilreaktionen der Photosynthese — etwa infolge verschiedener Fermentkonzentrationen — bei *Helodea* andere Werte besitzen als bei den von CALVIN benutzten Versuchsobjekten. Ist beispielsweise bei *Helodea* die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung einer bestimmten P-Verbindung viel kleiner als die für die Weiterreaktion in deren Folgeprodukt, so ist diese ^{32}P-Verbindung hier dauernd in so kleinen Mengen vorhanden, daß sie nicht nachweisbar ist. So kann es kommen, daß ein Zwischenprodukt der CO_2-Assimilation, das beispielsweise in *Chlorella* stets zu finden ist, bei *Helodea* nur deswegen nicht in Erscheinung tritt, weil hier die Geschwindigkeitskonstanten der beteiligten Reaktionen andere Werte besitzen (vgl. auch WEICHART 1959).

Außer den beiden eben genannten Gründen, die das Auffinden bestimmter Zwischenprodukte verhindern können, gibt es noch zwei weitere, die mit der hier angewandten Methodik zusammenhängen. Einmal können P-Verbindungen mit besonders großen R_f-Werten beim Entwickeln aus den Chromatogrammen herauslaufen, zum anderen besteht die Möglichkeit, daß einige organische P-Verbindungen mit dem anorganischen Orthophosphat koincidieren.

So wurde beispielsweise bei Verwendung von wassergesättigtem Phenol als Laufmittel (BENSON) eine P-Verbindung entdeckt, die — nach ihrem R_f-Wert zu urteilen — Dioxyacetonphosphat sein dürfte. (Eine genaue Identifizierung wurde noch nicht vorgenommen.) Da diese Substanz sehr große Hell-Dunkel-Unterschiede zeigte (Hell : Dunkel = 15 : 1), steht ihre Beteiligung an der Photosynthese außer Zweifel. Weiterhin konnte auf zweidimensionalen Chromatogrammen manchmal an der Stelle, wo sonst *nur* das anorganische Orthophosphat zu erkennen war, neben diesem eine Reihe anderer P-Verbindungen beobachtet werden, die ebenfalls ziemlich große Hell-Dunkel-Unterschiede aufwiesen. Hierüber sind weitere Versuche erforderlich.

Zusammenfassung

1. Zur Ermittlung der an der Photosynthese und der CO_2-Assimilation von *Helodea densa* beteiligten P-Verbindungen wurde deren Bildung im Hellen und im Dunkeln sowie bei verschiedenen CO_2-Partialdrucken untersucht. Hierbei diente radioaktives Phosphat ($^{32}PO_4'''$) als „tracer".

2. Für die Einlagerung des $^{32}PO_4'''$ in die *Helodea*-Blätter wurde eine Apparatur konstruiert, in der jede beliebige Gasatmosphäre innerhalb einiger Sekunden hergestellt werden konnte und die außerdem einen schnellen Flüssigkeitswechsel ermöglichte.

3. Für die zweidimensionale papierchromatographische Auftrennung der in den *Helodea*-Extrakten enthaltenen P-Verbindungen wurde eine neue Laufmittel-Kombination (Butanol-Gemisch und Methylglycol-Gemisch) gefunden, die besonders saubere Trennungen lieferte.

4. Es wurde festgelegt, unter welchen Bedingungen die für ^{32}P-Verbindungen gefundenen Analysenergebnisse auch für die entsprechenden ^{31}P-Verbindungen gelten.

5. Im *Licht* wurden in *Helodea*-Blättern bedeutend *größere Mengen* an Phosphoglycerinsäure, Phosphorenolbrenztraubensäure, Glucose-1- und -6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1,6-Diphosphat und Uridindiphosphat-Glucose gebildet als im Dunkeln. Aber auch bei Ribulose-1,5-Diphosphat und Adenosintriphosphat waren bei bestimmten Versuchszeiten die Hell-Dunkel-Unterschiede sehr groß. Phosphoglycerinsäure, Phosphorenolbrenztraubensäure, Glucose-1- und -6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1,6-Diphosphat, Uridindiphosphat-Glucose, Ribulose-1,5-Diphosphat und Adenosintriphosphat sind demnach an der Photosynthese von *Helodea* beteiligt.

6. Blätter, in denen durch lange Dunkelbehandlung eine Verarmung an organischen P-Verbindungen eingetreten war, bildeten bei nachfolgender Belichtung besonders große Mengen dieser Substanzen.

7. Durch *Erniedrigung* des *CO_2-Partialdruckes* gegenüber dem der Luft wurde im Licht die Bildung von Phosphoglycerinsäure, Glucose-1- und -6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1,6-Diphosphat und Uridindiphosphat-Glucose sehr stark herabgedrückt. Hieraus folgt, daß diese P-Verbindungen als Zwischenprodukte der CO_2-Assimilation von *Helodea* anzusehen sind.

8. Im Dunkeln zeigten Phosphoglycerinsäure, Glucose-1- und -6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat und Fructose-1,6-Diphosphat bei einer Erniedrigung des CO_2-Partialdruckes gerade das umgekehrte Verhalten wie im Licht.

9. Die Bildung von Adenosintriphosphat nahm bei einer Erhöhung des CO_2-Partialdruckes von 0,23 auf 38 mm Hg ab, und zwar im Licht *weniger* als im Dunkeln. Damit gewinnt die *Photosynthese-Phosphorylierung*, also die Bildung von „energiereichen" organischen P-Verbindungen

(z. B. Adenosintriphosphat) als eine Primärreaktion der Photosynthese, auch in lebenden Pflanzenzellen weiter an Wahrscheinlichkeit.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. SIMONIS, möchte ich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und für die mir stets zuteil gewordene Förderung herzlich danken. Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* bin ich für die gewährte finanzielle Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur

ALBAUM, H. G.: The metabolism of phosphorylated compounds in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **3**, 35—58 (1952).

ARNON, D. I.: The chloroplast as a complete photosynthetic unit. Science **122**, 9—16 (1955).

— Chloroplasts and photosynthesis. Brookhaven Symp. Biol. **11**, 181—235 (1959).

— The chloroplast as a functional unit in photosynthesis. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. V. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

— M. B. ALLEN and F. R. WHATLEY: Photosynthesis by isolated chloroplasts. Nature (Lond.) **174**, 394—396 (1954).

— — — Photosynthesis by isolated chloroplasts. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. Biochim. biophys. Acta **20**, 449—461 (1956).

— F. R. WHATLEY and M. B. ALLEN: Vitamin K as a cofactor of photosynthetic phosphorylation. Biochim. biophys. Acta **16**, 607—608 (1955).

— — — Photosynthesis by isolated chloroplasts. II. Photosynthetic phosphorylation, the conversion of light into phosphate bond energy. J. Amer. chem. Soc. **76**, 6324—6329 (1954).

BENSON, A. A., I. A. BASSHAM, M. CALVIN, T. C. GOODALE, V. A. HAAS and W. STEPKA: The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products. J. Amer. chem. Soc. **72**, 1710—1718 (1950).

BRADLEY, D. F.: Phosphate transient in photosynthesis. Arch. Biochem. **68**, 172 to 185 (1957).

BRAUNER, L.: Die Beeinflussung des Stoffaustausches durch Licht. In Handbuch für Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 381—397. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.

CALVIN, M.: The photosynthetic carbon cycle. Conferences et rapports présentés au 3 ème congrès intern. de Biochimie, Bruxelles 1955, p. 211—225. Liège 1956.

— Der Photosynthese-Cyclus. Angew. Chem. **68**, 253—264 (1956).

GIBBS, M., and O. KANDLER: Asymmetric distribution of C^{14} in sugars formed during photosynthesis. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 446—451 (1957).

GORDON, S. A., and K. SURREY: Red, far-red interaction in oxydative phosphorylation. Plant Physiol. **33**, Suppl., XXIV (1958).

GRUBE, K. H.: Über den Zusammenhang von Phosphathaushalt und Photosynthese bei *Helodea densa*. Planta (Berl.) **42**, 279—303 (1953).

HANES, C. S., and F. A. ISHERWOOD: Separation of phosphoric esters on the filter paper chromatogram, Nature (Lond.) **164**, 1107—1112 (1949).

KANDLER, O.: Über die Beziehung zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese. IV. Zur Frage einer stöchiometrischen Beziehung zwischen CO_2-Reduktion und Phosphatumsatz. Z. Naturforsch. **12**b, 271—280 (1957).

—, u. M. GIBBS: Untersuchungen über den Einfluß der Photosynthese auf die Austauschvorgänge innerhalb des Hexosemoleküls. Z. Naturforsch. **14**b, 8—13 (1959).

Kues, G.: Zur lichtabhängigen Phosphorylierung und papierchromatographischen Trennung von ^{32}P-markierten Verbindungen bei der Grünalge *Ankistrodesmus*. Diss. Techn. Hochschule Hannover 1958. 119 S.

Metzner, H., H. Simon and B. Metzner: Instabile CO_2-Fixierung und Photosynthese. Z. Naturforsch. **13**b, 366—374 (1958).

— — — and M. Calvin: Evidence for an unstable CO_2 fixation product in algal cells. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 892—895 (1957).

Mortimer, D. C.: Paper chromatography separation of some biologically important phosphate esters. Canad. J. Chem. **30**, 653—660 (1952).

— Evidence for an alternate pathway in photosynthetic assimilation. Naturwissenschaften **45**, 116—117 (1958).

Palmcrantz, P.: Über Züchtung von *Elodea densa*. Beitr. Biol. Pflanz. **29**, 220 bis 231 (1953).

Pirson, A., u. A. Kuhl: Über den Phosphathaushalt von *Hydrodictyon*. I. Arch. Mikrobiol. **30**, 211—225 (1958).

Quensell, E.: Untersuchungen über die Wirkung der Monojodessigsäure auf die lichtabhängige Phosphorylierung bei *Helodea crispa*. Diss. Techn. Hochschule Hannover 1957. 115 S.

Simonis, W.: Zusammenhänge zwischen Phosphorstoffwechsel und Photosynthese der Pflanzen. Untersuchungen unter Verwendung von ^{32}P. Atompraxis **5**, 272 bis 275 (1959).

— Photosynthese und lichtabhängige Phosphorylierung. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. V/1, S. 966—1013. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Simonis, W., u. K. H. Grube: (1) Untersuchungen über den Zusammenhang von Phosphathaushalt und Photosynthese. Z. Naturforsch. 7b, 194—196 (1952).

— — (2) Weitere Untersuchungen über Phosphathaushalt und Photosynthese. Z. Naturforsch. 8b, 312—317 (1953).

—, u. M. Ehrenberg: Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. IV. Die Wirkung des Lichtes auf die ^{32}P-Einlagerung bei chlorophyllfreien Pflanzenzellen und -geweben. Z. Naturforsch. **12**b, 156—163 (1957).

— H. Kating u. G. Kues: Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. V. Methodische Fragen zur Extraktion und Papierchromatographie von ^{32}P-markierten Verbindungen aus Algen. Z. Naturforsch. **12**b, 812—813 (1957).

—, u. G. Weichart: (1) Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. VI. Quantitative Unterschiede der Bildung von ^{32}P-markierten phosphorylierten Verbindungen in *Helodea*. Z. Naturforsch. **13**b, 55—56 (1958).

— — (2) Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. VII. Die Wirkung von Monojodessigsäure auf die Bildung von ^{32}P-markierten phosphorylierten Verbindungen in *Helodea densa* (Phosphoglycerinsäure — ein Zwischenprodukt der Photosynthese?). Z. Naturforsch. **13**b, 694—696 (1958).

Strehler, B. L.: Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. II. Adenosine triphosphate and photosynthesis. Arch. Biochem. **43**, 67—79 (1953).

Weichart, G.: (1) Untersuchungen über Phosphorylierungs-Prozesse bei der CO_2-Assimilation höherer Pflanzen *(Helodea)* unter Verwendung von radioaktivem Phosphat. Diss. Techn. Hochschule Hannover 1959. 153 S.

— (2) Kinetische Betrachtungen und Untersuchungen über einige an der CO_2-Assimilation höherer Pflanzen *(Helodea)* beteiligte Phosphor-Verbindungen bei Verwendung von radioaktivem Phosphat. Biochem. Z. (in Vorbereitung).

Dipl.-Chem. Dr. rer. nat. Günter Weichart,
z. Z. Kali-Forschungs-Institut, Hannover, Georgstr. 29

Planta 56, 290—301 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Gießen
(Direktor: Prof. Dr. D. v. Denffer)

DIE SCHÄDIGUNG VON *VICIA FABA*-SAMEN DURCH TROCKNUNG — EIN UMKEHRBARER EFFEKT

Von

Walter Klingmüller

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. November 1960)

Daß Trockenheit die Lebensfähigkeit von Saatgut günstig beeinflußt, ist allgemein bekannt. In der Praxis wird empfohlen, den Luftwassergehalt des Lagerraumes oder -behälters möglichst weit herunterzudrücken und während der ganzen Lagerungszeit niedrig zu halten, um den Rückgang der Keimfähigkeit eines Saatgutpostens zu verzögern (Lowig 1953, 1954). Auf Einschränkungen und Ausnahmen hat kürzlich Schoorel (1958, 1959) hingewiesen. So werden einige Samenarten der gemäßigten Zonen, vor allem aber die Samen vieler tropischer Pflanzen durch Trockenheit geschädigt. In diese Kategorie gehören offenbar auch die Samen von *Vicia faba minor*. Für sie konnten wir zeigen, daß bereits eine geringe Austrocknung über $CaCl_2$ im Exsiccator genügt, um die Keimfähigkeit herabzusetzen und Wurzel- und Sproßwachstum beträchtlich zu verzögern (Klingmüller 1959, Klingmüller und Lane 1960). Im folgenden wird über Ergebnisse berichtet, die für die weitere Aufklärung dieser Erscheinung wichtig sind.

Material und Methodik

Als Material diente *Vicia faba*, var. *minor*, Throws M. S. Winter Beans (reine Linie Ernte 1958, Hybridsaatgut Ernte 1959) der Firma Hasler & Co., Ltd., Dunow, Essex, England[1].

Die Bohnen wurden verlesen, in gleiche Teile geteilt, und wo nicht anders angegeben, im Exsiccator mit oder ohne $CaCl_2$ als Trocknungsmittel bei $20 \pm 1/2^0$ C 3 Wochen im Dunkeln gelagert. Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurden Proben von 20 Bohnen grob zerkleinert und 7 Tage bei 105^0 C getrocknet. In der Mehrzahl der Versuche wurde die Samenschale punktiert, und zwar seitlich an dem der Keimwurzel abgewandten Ende. Die Keimprüfungen wurden nach der offiziellen Vorschrift im Sandkeimbett durchgeführt (Eggebrecht 1949). Bei den Wachstumsversuchen kamen die Bohnen für die ersten 8 Std der Quellung in Gruppen zu 60 Stück in belüftetes quarzdestilliertes Wasser ($20 \pm 1/4^0$ C, Dunkelheit). Längere Einquellzeiten verursachen unter anaeroben Bedingungen nach Rieger und Michaelis (1958) Chromosomenaberrationen. Die vorgequollenen Bohnen wurden dann zu je 20 Stück in Töpfe mit feuchtem Sägemehl ausgepflanzt und bei $20 \pm 1/2^0$ C 11 Tage im Dunkeln bzw. 12 Tage im Licht (etwa 4500 Lux,

[1] Für die kostenlose Lieferung sei auch an dieser Stelle verbindlich gedankt.

Leuchtstoffröhren Typ Philips TL 65 W/32 De Luxe A 032) herangezogen. Den graphischen Darstellungen liegen Messungen an je 60 Bohnen (3 Töpfe zu 20 Stück) zugrunde. Die Prüfung der Differenzen erfolgte mittels Varianzanalyse. Für die cytologische Untersuchung wurden die Bohnen in feuchtem Sand bei $20 \pm {}^1/_4{}^\circ$ C im Dunkeln angekeimt, die Wurzelspitzen für 6 Std in 0,05% Colchicin überführt (Evans et al. 1957), anschließend in Carnoy fixiert, feulgengefärbt, und als Quetschpräparate mittels Trockeneis (Conger u. Fairschild 1953) in Euparal haltbar gemacht. Ausgewertet wurden 25 vollständige Metaphaseplatten je Wurzelspitze und 4 Wurzelspitzen pro Behandlungsart.

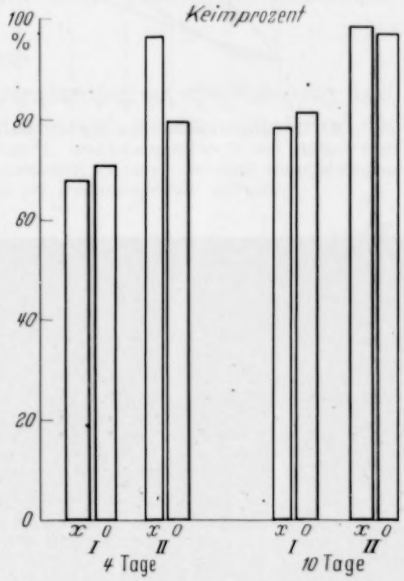


Abb. 1. Keimprozent von *Vicia faba* var. *minor* nach 4 Tagen und 10 Tagen im Sandkeimbett. Samen einer reinen Linie (*I*) bzw. Hybridsaatgut (*II*), punktiert (*x*) bzw. unpunktiert (*o*)

Quellung und Keimung

Quellung und Keimung der beiden geprüften Linien verlief unterschiedlich (Abb. 1). Die Keimschnelligkeit (Keimprozent nach 4 Tagen, Eggebrecht 1949) der reinen Linie (Wassergehalt 11,6%) betrug für unpunktierte Samen 71%, die Keimfähigkeit (Keimprozent nach 10 Tagen) 81%. Die Keimschnelligkeit des Hybridsaatguts (Wassergehalt 11,8%) betrug 80%, seine Keimfähigkeit 97%.

Punktieren steigerte die Keimschnelligkeit des Hybridsaatgutes auf 96%, blieb hingegen bei Samen der reinen Linie wirkungslos. Ursache für die unterschiedliche Wirkung des Punktierens war ein Unterschied in der Hartschaligkeit der Samen. Ein hoher Prozentsatz des Hybridsaatgutes begann die Wasseraufnahme stark verzögert oder gar nicht (Abb. 2). Über Hartschaligkeit bei Leguminosen vgl. Barton 1947, Crocker und Barton 1953, sowie Burns 1959. Im vorliegenden Fall wird die Hartschaligkeit durch das Punktieren überwunden. Die Entwicklung der Samen innerhalb einer Probe beginnt dann gleichzeitig und verläuft beim Hybridsaatgut wesentlich schneller als bei Samen der reinen Linie. Es hat sich gezeigt, daß bei stärkerer Austrocknung auch die Samen der reinen Linie hartschalig werden (Wassergehalt 9%).

Das Punktieren muß direkt vor dem Einquellen geschehen, da Punktieren mehrere Wochen vorher einen schädigenden Einfluß hat. Er macht sich besonders bei stark getrocknetem Material in einer Reduktion von Sproß- und Wurzellänge gegenüber Keimlingen von kurz vor

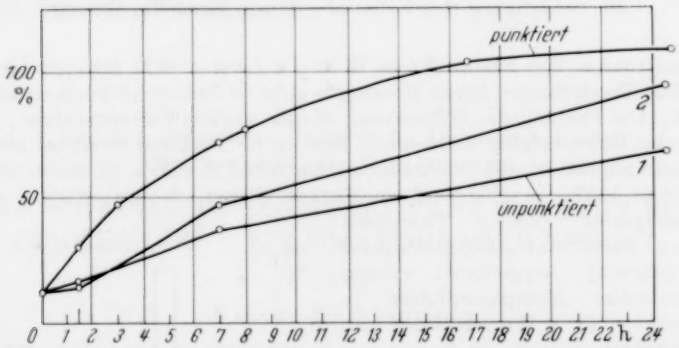
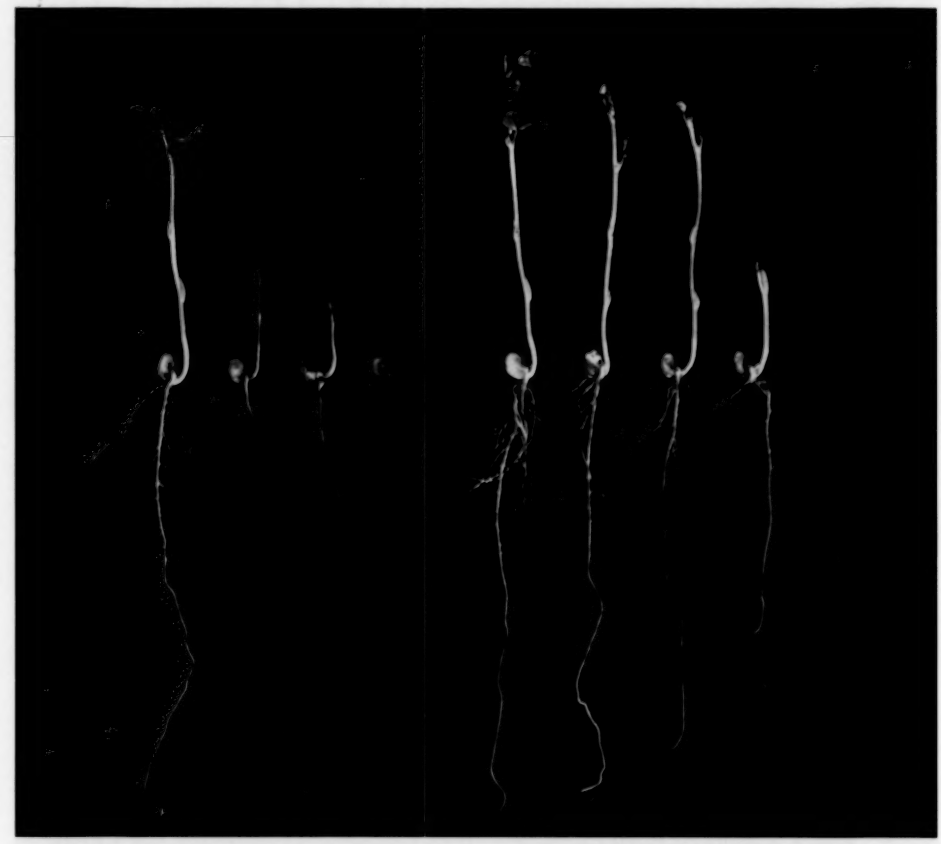


Abb. 2. Wasseraufnahme des Hybridsaatgutes während der ersten 24 Std der Quellung in Prozent des Trockengewichtes. Punktierte Samen und 2 verschiedene Proben von unpunktierten Samen. Letztere veranschaulichen die durch Hartschaligkeit der Samen bedingten Schwankungen im Quellverlauf falls nicht punktiert wird



a b

Abb. 3a u. b. Reduktion von Sproß- und Wurzellänge nach Trocknen der Samen. a 12 Tage alte Pflanzen, die aus Samen mit 8,2 % Wassergehalt gezogen wurden. Die 20 Bohnen der Probe wurden nach der Sproßlänge geordnet, abgebildet sind Nr. 3, 9, 10 und 18. b Kontrolle zu 3a. Wassergehalt der Samen zu Quellbeginn 12,5 %

dem Quellen punktierten Samen bemerkbar (p Sproß- und Wurzelreduktion 0,01—0,001, 11 F. G.). Auch bei Material von mittlerem Wassergehalt deutet sich der Effekt an (p Sproßreduktion = 0,05, 11 F. G.). Versuche, die Hartschaligkeit durch Vorquellen der Samen in Pril (0,5 g/Liter für 90 min) zu überwinden, verliefen negativ. Für alle folgenden Untersuchungen wurden direkt vor dem Quellbeginn punktierte Samen benutzt.

Wachstum

Der schädigende Einfluß der Samentrocknung auf die Keimung und auf das Wachstum der Keimlinge bestätigte sich erneut (Abb. 3 und 4).

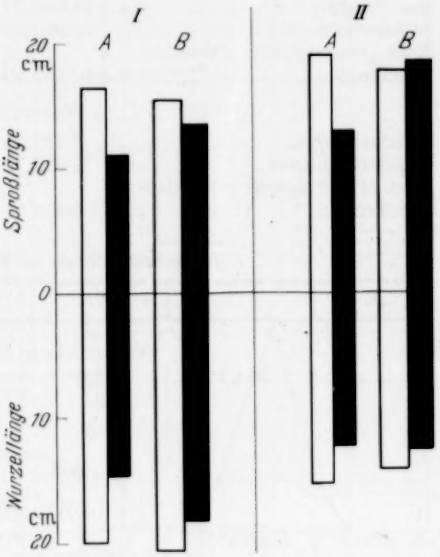


Abb. 4. Reduktion von Sproß- und Wurzellänge nach Trocknen der Samen und Aufhebbarkeit des Effektes durch Rückquellung. Versuch I gemessen nach 12tägigem Wachstum im Licht, Versuch II nach 11tägigem Wachstum im Dunkeln

IA schwarz: Getrocknete Bohnen, Wassergehalt 8,6 %,
IA weiß: Kontrollen dazu, Wassergehalt 11,7 %,
IB schwarz: Getrocknete und anschließend rückgequollene Bohnen, Wassergehalt 9,6 %,
IB weiß: Kontrollen dazu, Wassergehalt 10,7 %.
IIA schwarz: Getrocknete Bohnen, Wassergehalt 8,1 %,
IIA weiß: Kontrollen dazu, Wassergehalt 11,9 %,
IIB schwarz: Getrocknete und anschließend rückgequollene Bohnen, Wassergehalt 12,4 %,
IIB weiß: Kontrollen dazu, Wassergehalt 13,6 %

So betrug die mittlere Sproßlänge von Bohnen, die aus Samen mit 8,6% Wassergehalt gezogen wurden, am 12. Tag 11,3 cm, die Wurzellänge 14,6 cm, im Gegensatz zu 16,5 bzw. 20,2 cm bei Pflanzen aus Samen mit 11,7% Wassergehalt (p Sproßreduktion $< 0{,}05$, p Wurzelreduktion $< 0{,}01$, 11 F. G.).

Als neuer, bemerkenswerter Befund kommt hinzu, daß die durch das Trocknen gesetzte Schädigung vollständig aufgehoben werden kann. In den der Abb. 4 zugrunde liegenden Versuchen wurde ein Teil der getrockneten Bohnen nicht sofort eingequollen, sondern mehrere Wochen in Zimmerluft gelagert. Der Wassergehalt der Samen stieg dabei wieder an und näherte sich dem entsprechend gelagerter Kontrollen (Rückquellung). Solche rückgequollenen Bohnen stimmten in Sproß- und Wurzelwachstum vollständig mit den Kontrollen überein. Die noch auftretenden Differenzen waren nicht signifikant ($p > 0{,}05$).

Tabelle 1. *Endanalysen zum Sproß- und Wurzelwachstum*

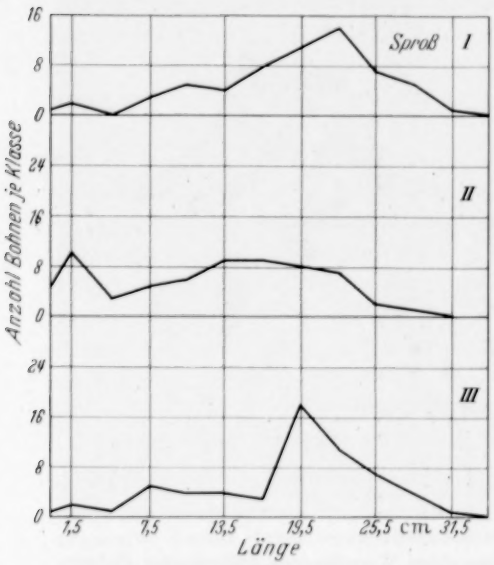
Variationsursache	S. q. A.	F. G.	V	F	P
		Versuch I: a) Sproßlängen			
Feuchtigkeit	19220,16	3	6406,72	6,82	0,05—0,01
Wiederholungen	2177,81	2	1088,90	1,16	> 0,2
Rest (Feuchtigkeit × Wiederholungen)	5637,05	6	939,51		
		b) Wurzellängen			
Feuchtigkeit	26679,70	3	8893,23	14,87	0,01—0,001
Wiederholungen	1158,76	2	579,38	0,97	> 0,2
Rest (Feuchtigkeit × Wiederholungen)	3588,40	6	598,07		
		Versuch II: a) Sproßlängen			
Feuchtigkeit	28886,97	3	9628,99	5,52	0,05—0,01
Wiederholungen	2990,89	2	1495,44	0,86	> 0,2
Rest (Feuchtigkeit × Wiederholungen)	10463,99	6	1744,00		
		b) Wurzellängen			
Feuchtigkeit	7317,23	3	2439,08	2,30	0,2—0,05
Wiederholungen	1529,77	2	764,88	0,72	> 0,2
Rest (Feuchtigkeit × Wiederholungen)	6368,91	6	1061,48		

Differenzentabelle zu den Endanalysen

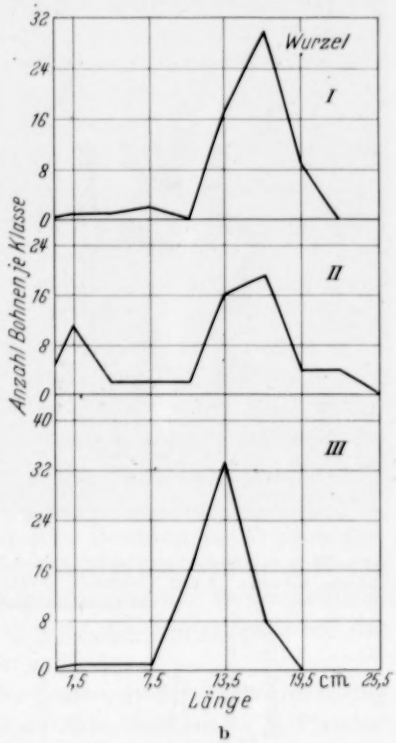
K	C	KR	CR	Summe	
		Versuch I: a) Sproßlängen			
	314,7^{+}	62,6^{-}	179,4^{-}	992,1	K
		252,1^{+}	135,3^{-}	677,4	C
			116,8^{-}	929,5	KR
				812,7	CR
		$V^{+} = 209$,	$V^{++} = 345$		
		b) Wurzellängen			
	325,7^{++}	37,8^{-}	110,5^{-}	1201,3	K
		363,5^{++}	215,2^{+}	875,6	C
			148,3^{-}	1239,1	KR
				1090,8	CR
		$V^{+} = 167$,	$V^{++} = 276$		
		Versuch II: a) Sproßlängen			
	367,6^{+}	73,1^{-}	26,2^{-}	1143,4	K
		294,5^{+}	341,4^{+}	775,8	C
			46,9^{-}	1070,3	KR
				1117,2	CR
		$V^{+} = 283$,	$V^{++} = 470$		
		b) Wurzellängen			
	181,2^{-}	67,5^{-}	166,0^{-}	919,6	K
		113,7^{-}	15,2^{-}	738,4	C
			98,5^{-}	852,1	KR
				753,6	CR
		$V^{+} = 221$,	$V^{++} = 367$		

Symbole: C = getrocknete Bohnen; K = ungetrocknete Bohnen (Kontrolle zu C); CR = getrocknete und anschließend rückgequollene Bohnen; KR = ungetrocknete Bohnen (Kontrolle zu CR); $V^{+} = p < 0{,}05$; $V^{++} = p < 0{,}01$.

Tabelle 1 gibt die Endanalysen und Differenzentabellen zur Varianzanalyse für zwei solcher Versuche, getrennt nach Sproß- und Wurzellängen. Der Trocknungsschaden war in Versuch II nur bei den Sprossen signifikant. Gegen die Prüfung der Differenzen mittels Varianzanalyse könnte geltend gemacht werden, daß dies streng genommen nur dann erlaubt ist, wenn die zugrunde liegenden Meßwerte in etwa der Normal-



a



b

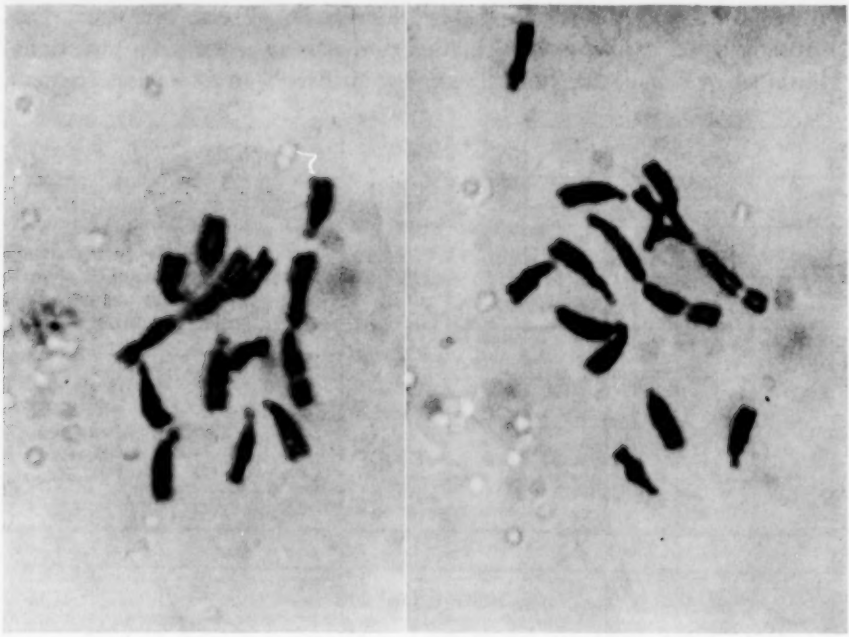
Abb. 5a u. b. Anzahl Bohnen je Längenklasse von 3 cm, getrennt nach Sproß (a) und Wurzel (b). Populationen von 60 Stück. Wachstum für 11 Tage im Dunkeln. *I* Kontrolle (Wassergehalt bei Quellbeginn 11,9 %), *II* getrocknete Bohnen (Wassergehalt bei Quellbeginn 8,1 %), *III* getrocknete und anschließend rückgequollene Bohnen (Wassergehalt bei Quellbeginn 12,4 %)

verteilung folgen. Eine entsprechende Aufgliederung führte zu Abb. 5. In ihr sind für einen der beiden Versuche die Anzahl Bohnen je Längenklasse von 3 cm getrennt nach Sproß- und Wurzellängen aufgetragen (Kontrollbohnen, getrocknete und rückgequollene Bohnen). Die Längen der Kontrollbohnen sind normalverteilt. Bei den getrockneten Bohnen ergibt sich eine mehr oder weniger scharfe Aufteilung der Population in 2 Gruppen, deren eine wenig gestörtes Wachstum, deren andere fast vollständig gehemmtes Wachstum zeigt. Rückgequollene Bohnen entsprechen den Kontrollen (Normalverteilung).

Cytologische Untersuchung

Die Keimung der getrockneten Bohnen begann verzögert (Durchbruch der Keimwurzel am 3. Tag, bei den Kontrollen am 2. Tag). Die

ersten Mitosen waren bei den Kontrollen an Wurzeln von $\geqq 0{,}6$ cm zu beobachten. Zur Prüfung auf Chromosomenaberrationen wurden 3 Tage



a b

Abb. 6a u. b. Metaphaseplatten von 3 Tage alten Wurzelspitzen getrockneter Bohnen (Länge 0,8 cm). 6 Std Colchicin, Feulgen-Färbung, Vergr. 1440×. a Normales Bild, b Chromatidentranslokation T' (Mm)

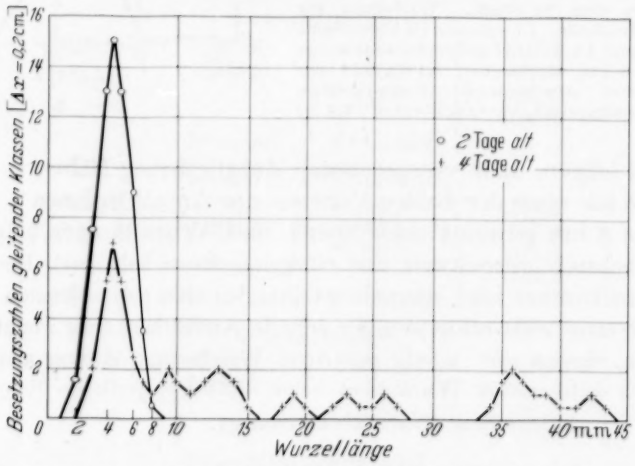


Abb. 7. Länge der Keimwurzeln getrockneter Bohnen nach 2tägigem Wachstum (26 Bohnen) und 4tägigem Wachstum (23 Bohnen). Darstellung mittels gleitender Klassen der Breite, $\Delta x = 0{,}2$ cm

alte Wurzelspitzen der getrockneten Bohnen mit einer Länge von 0,6 bis 0,9 cm ausgewählt. Nur eine einzige Aberration wurde gefunden (Chromatiden-Translokation *T'*, *Mm*, auf 100 normale Metaphasen, Abb. 6).

Die Analyse der Wurzelspitzenlängen von Trockenbohnen mittels gleitender Klassen (Abb. 7) läßt erkennen, daß nach 2tägiger Keimung eine eingipflige Verteilung vorliegt (Mittelwert bei 4,5 mm Wurzellänge). Sie geht bis zum folgenden Tag in eine zweigipflige Verteilung über, wie sie schon in Abb. 5 für 12 Tage alte Pflanzen nachgewiesen wurde. In Abb. 7 ist neben der Normalverteilung von Längen 2 Tage alter Wurzelspitzen die Verteilung der Längen am 4. Tage der Keimung gezeigt.

Diese Aufgliederung der Population bei der Keimung läßt es möglich erscheinen, daß die auf Chromosomenaberrationen geprüften Wurzelspitzen zu nur wenig geschädigten Bohnen gehörten (2. Gipfel). Es wurden deshalb zusätzlich Wurzelspitzen geprüft, die nach 4tägigem Wachstum eine Länge von 0,5—0,6 cm besaßen. Dies entspricht dem 1. Gipfel der Kurve II in Abb. 7 und damit den schwer geschädigten Bohnen. Die Zellen in diesen Wurzelspitzen befinden sich jedoch noch in Interphase. Teilungen waren nicht zu beobachten.

Deutung der Befunde

Haber und Tolbert (1959) haben kürzlich mittels S^{35} und P^{32} gezeigt, daß bei Salatsamen infolge von Hartschaligkeit der Eiweiß- und Nucleinsäurestoffwechsel verzögert beginnt. Sie konnten diese Verzögerung durch Punktieren ausschalten. Eine Deutung des Trocknungsschadens bei *Vicia*-Samen auf dieser Basis scheidet aus, weil der Schaden bei punktierten und unpunktierten Samen in gleicher Weise deutlich wird. Die getrockneten Samen bleiben trotz des Punktierens bei der Keimung hinter den nicht getrockneten zurück.

Genkel und Chao Shih-Hsü (1958) fanden, daß bei Austrocknung von Kaffee-Samen (4 Tage über 50%iger Schwefelsäure) die Plasmodesmen zwischen den Zellen des Embryos reißen. Sie führen die starke Keimschädigung von Kaffee-Samen bei Austrocknung darauf zurück. Bei fettreichen Samen können durch extreme Austrocknung Fettabbauprodukte entstehen (Ranzigwerden). Diese könnten über eine Vergiftung des Stoffwechsels zu Wachstumsstörungen führen (Konzak, mündliche Mitteilung). Diese und die vorherstehende Deutungsmöglichkeit fallen aus, weil der Effekt, wie gezeigt wurde, reversibel ist.

Nach Bünning und Bauer (1952) sind bei *Digitalis*-Samen jahresperiodische Schwankungen der Keimfähigkeit mit Schwankungen im Wassergehalt der Samen verbunden, wobei dem Minimum des Wassergehaltes ein Minimum der Keimbereitschaft entspricht. Man könnte danach vermuten, daß der Trocknungsvorgang bei *Vicia*-Samen eine Keimruhe induziert, die sich in der beobachteten Keimungs- und Wachs-

tumsverzögerung auswirkt. Bereits die Untersuchungen BÜNNINGs und BAUERs zeigten aber, daß auch Samen ohne eine derartige Korrelation vorkommen (*Lepidium*). Für Samen von *Dactylis* wurde inzwischen sogar die gegenteilige Korrelation gefunden (KUMMEROW 1960). Gegen eine trocknungsinduzierte Keimruhe spricht die Tatsache, daß getrocknete Samen von *Vicia faba minor* gegen Röntgenstrahlen empfindlicher sind als solche mit mittlerem Wassergehalt (KLINGMÜLLER 1959, 1960a und b). Darauf soll in einer folgenden Arbeit ausführlicher eingegangen werden.

In ganz andere Richtung weisen Ergebnisse von Messungen, bei denen an Bohnen von verschiedenem Wassergehalt die Geschwindigkeit

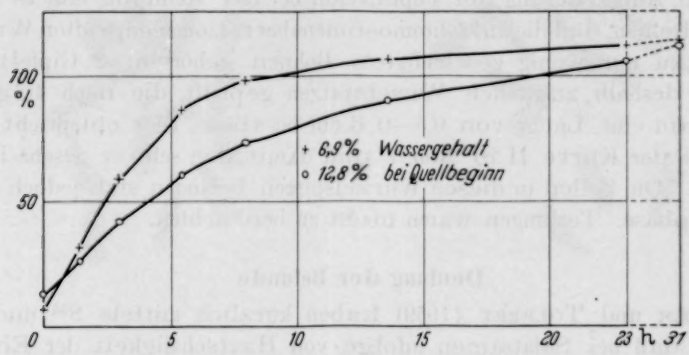


Abb. 8. Wasseraufnahme getrockneter Bohnen und ungetrockneter Bohnen während der ersten 31 Std der Quellung. Punktierte Samen mit 6,9 % Wassergehalt (+) und 12,8 % Wassergehalt (○) bei Quellbeginn

der Wasseraufnahme bei der Quellung verfolgt wurde (Abb. 8). Es zeigte sich, daß die Wasseraufnahme bei den getrockneten Bohnen in den ersten 24 Std wesentlich schneller verläuft als bei Bohnen von mittlerem Wassergehalt. Es wäre möglich, daß eine übereilte Wasseraufnahme zu Beginn der Quellung den Embryo schädigt, was bereits WERCKMEISTER (1934, 1936, zitiert nach KARTASCHOFF) bei Samen von *Iris* in Erwägung gezogen hat. Die vollständige Reversibilität des Schadens spricht für einen derartigen Mechanismus. Weitere Untersuchungen an anderen Samenarten sind notwendig, um diesen Deutungsvorschlag zu überprüfen.

Diskussion

Wichtig erscheinen uns die vorstehend mitgeteilten Ergebnisse in doppelter Hinsicht:

Erstens haben bereits vor längerer Zeit GRAY und SCHOLES (1951) darauf hingewiesen, daß die bei *Vicia faba* durch Röntgenstrahlen induzierte Wachstumshemmung eng mit Schädigungen des Chromosomensatzes korreliert ist. Dies wurde in letzter Zeit von NEARY et al. (1959), READ (1959) und CALDECOTT (1960) erneut herausgestellt, während

Wolff (1960) gegenteilige Ergebnisse erhielt. Im vorliegenden Fall handelte es sich ebenfalls um eine Wachstumshemmung, doch besteht dabei im Gegensatz zu der durch Röntgenstrahlen bewirkten Hemmung keinerlei Zusammenhang mit Chromosomenaberrationen. Eine Hemmung des Längenwachstums bei *Vicia faba* braucht demnach nicht unbedingt mit Chromosomenaberrationen gekoppelt zu sein. Letztere sind nur eine mögliche, nicht aber eine notwendige Voraussetzung für die Hemmung des Längenwachstums von Sproß und Wurzel. Die Angaben von Wolff gewinnen dadurch an Interesse.

Zweitens ist seit einigen Jahren bekannt, daß im Gegensatz zu früheren Vorstellungen extrem trockene Samen gegen Röntgenstrahlen sehr viel empfindlicher sind als Samen mit mittlerem Wassergehalt (Caldecott 1955, Ehrenberg 1955). Seither haben zahlreiche Autoren diesen bemerkenswerten Effekt studiert, in der Hoffnung, an extrem trockenen Samen in eleganter Weise Aufschluß über die physikalischen und biochemischen Primärvorgänge der Strahlenwirkung zu erhalten. Man denkt dabei an die strahlenbedingte Erzeugung freier Radikale und deren schädigende Wirkung im trockenen Samen, in dem sie eine längere Lebensdauer besitzen (A. und L. Ehrenberg 1958, Klingmüller et. al. 1959). Über eine schädigende Wirkung der Trocknung selbst wurde in diesem Zusammenhang bisher von anderen Autoren nicht berichtet.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß bei allen derartigen Untersuchungen dem unmittelbaren Einfluß der Trocknung Beachtung geschenkt werden muß. Einerseits können ohne solche Rücksichtnahme erhebliche Irrtümer entstehen, andererseits ist es durchaus möglich, daß für die Deutung der erhöhten Strahlenempfindlichkeit von trockenen Samen nicht nur Radikalwirkungen in Frage kommen, sondern auch andere Ursachen, die zunächst weniger „interessant" anmuten mögen, eine Rolle spielen. Genannt seien hier die Auswirkung besonders rascher Quellung auf den noch unmodifizierten Strahlenschaden, oder die Entstehung sensibilisierender Stoffwechselprodukte während der Trocknung (Bowen 1960).

Summary

1. Seeds of *Vicia faba minor* are damaged by drying them over $CaCl_2$ at 20° to water contents below about 9%. The damage is shown by a slowing down of germination and a reduction of shoot and root length measured at the 11th. or 12th day of growth.

2. Arranging the growth data in classes according to shoot and root length results in a normal distribution for those from medium water content seeds and a bimodal distribution for those from dry seeds.

3. Seeds which had been dried and brought back to medium water content by storing them in the room, produced normal seedlings closely corresponding to the controls.

4. No chromosome damage was observed in seedlings grown from dry seeds.

5. Water uptake in dry beans is more rapid during the first 24 hours of soaking than in beans of medium water content. This, seen in combination with point 3, suggests that the observed damage may be caused by the abnormally rapid water uptake of the dried embryo during the early soaking period.

Ich danke Herrn Professor Dr. A. STÄHLIN vom Institut für Grünlandwirtschaft unserer Universität für Durchsicht des Manuskriptes und wertvolle Hinweise, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung dieser Untersuchungen und Fräulein DIETLIND BARTELS für technische Assistenz.

Literatur

BARTON, L. V.: Special studies on seed coat impermeability. Contr. Boyce Thompson Inst. **14**, 355—362 (1947).

BOWEN, H. J M.: Effects of seed extracts on radiosensitivity. Symposium on the effects of ionizing radiation on seeds and their significance for crop improvement. Karlsruhe 1960.

BÜNNING, E., u. E. W. BAUER: Über die Ursachen endogener Keimfähigkeitsschwankungen in Samen. Z. Bot. **40**, 67—76 (1952).

BURNS, R. E.: Effect of acid scarification on lupine seed impermeability. Plant Physiol. **34**, 107—108 (1959).

CALDECOTT, R. S.: Effects of ionizing radiations on seeds of barley. Radiat. Res. **2**, 339—350 (1955).

— Effects of hydration on X-ray sensitivity in *Hordeum*. Radiat. Res. **3**, 316—330 (1955).

— Seedling height, oxygen availability, storage and temperature: Their relation to radiation-induced genetic and seedling injury in barley. Symposium on the effects of ionizing radiation on seeds and their significance for crop improvement. Karlsruhe 1960.

CONGER, A. D., and L. M. FAIRCHILD: A quick-freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol. **28**, 281 (1953).

CROCKER, W., and L. V. BARTON: Physiology of seeds. Waltham, Mass., U.S.A.: Chronica Botanica Company 1953.

EGGEBRECHT, H.: Die Untersuchung von Saatgut. Methodenbuch, Bd. V. Radebeul u. Berlin 1949.

EHRENBERG, A., and L. EHRENBERG: The decay of X-ray induced free radicals in plant seeds and starch. Ark. Fysik **14**, 133—141 (1958).

EHRENBERG, L.: Factors influencing radiation induced lethality, sterility, and mutations in barley. Hereditas (Lund) **41**, 123—146 (1955).

— The radiation induced growth inhibition in seedlings. Bot. Not. (Lund) **108**, 184—215 (1955).

EVANS, H. J., G. J. NEARY and S. M. TONKINSON: The use of colchicine as an indicator of mitotic rate in broad bean root meristems. J. Genet. **55**, 487—502 (1957).

GENKEL, P. A., and CHAO SHIH-HSÜ: The role of plasmodesmata in the loss of germination ability of coffee (Coffea robusta Linn.) seeds. Plant Physiol. (Fiziol. Rastenii) **5**, 303—307 (1958).

GRAY, L. H., and M. E. SCHOLES: The effect of ionizing radiations on the broad bean root. Part VIII. Growth rate studies and histological analyses. Brit. J. Radiol. **24**, 82 (1951).

Haber, A. H., and N. E. Tolbert: Metabolism of C^{14}-bicarbonate, P^{32}-phosphate, or S^{35}-sulfate by lettuce seed during germination. Plant Physiol. **34**, 376—380 (1959).

Kartaschoff, R.: Die Keimverzögerung der Samen von *Iris pseudacorus* L. Ber. Schweiz. bot. Ges. **68**, 145—182 (1958).

Klingmüller, W.: Zur Möglichkeit eines nachträglichen Strahlenschutzes bei Samen von *Vicia faba*. Z. Naturforsch. **14b**, 268—272 (1959).

— Zur Frage einer jahresperiodischen Änderung der Strahlenempfindlichkeit bei Gerste. Naturwissenschaften **11**, 261—262 (1960a).

— Radiation damage in *Vicia faba* seeds. Symposium on the effects of ionizing radiation on seeds and their significance for crop improvement. Karlsruhe 1960b.

—, and G. R. Lane: Damaging effect of drying on *Vicia faba* seeds. Nature (Lond.) **185**, 699—700 (1960).

— — M. C. Saxena and D. J. E. Ingram: Free radicals in X-rayed seeds of high and low water content, as measured by electron spin resonance. Nature (Lond.) **184**, 464—465 (1959).

Kummerow, J.: Endogene Schwankungen der Keimfähigkeit bei *Dactylis glomerata*. Naturwissenschaften **11**, 262 (1960).

Lowig, E.: Beiträge zur Frage der Saatgutlagerung. I und II. Saatgutwirtschaft **5**, 148—150 (1953); **6**, 124—127 (1954).

Neary, G. J., H. J. Evans, S. M. Tonkinson and F. S. Williamson: The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part III. Mitotic delay. Int. J. Rad. Biol. **1**, 230—240 (1959).

Neary, G. J., S. M. Tonkinson and F. S. Williamson: The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part. I. Reduction of root growth. Int. J. Rad. Biol. **1**, 201—215 (1959).

Read, J.: Radiation biology of *Vicia faba* in relation to the general problem. Oxford 1959.

Rieger, R., u. A. Michaelis: Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba* L. I. Der Einfluß der Unterwasser-Quellung der Samen auf die chromosomale Aberrationsrate. Chromosoma (Berl.) **9**, 238—257 (1958).

Schoorel, A. F.: De invloed van extreme temperaturen en van uitdroging op de kiemkracht van zaden. Het Landbouwk. Tijdschr. **70**, 117—122 (1958).

— The influence of extreme temperatures and desiccation on the germination of seeds. XII. International Seed Testing Convention, Oslo 1959.

Werckmeister, P.: Über die künstliche Aufzucht von Embryonen aus *Iris*-Bastardsamen. Gartenbauwiss. **8**, 607—608 (1934).

— Über Herstellung und künstliche Aufzucht von Bastarden der Gattung *Iris*. Gartenbauwiss. **10**, 500—520 (1936).

Wolff, S.: Post-irradiation storage and the growth of barley seedlings. Symposium on the effects of ionizing radiation on seeds and their significance for crop improvement. Karlsruhe 1960.

Dipl.-Biol. Dr. W. Klingmüller,
Botanisches Institut der Universität, Gießen, Senckenbergstr. 17—21

Planta 56, 302—308 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

ÜBER DEN EINFLUSS DES LICHTS AUF DIE CAROTINOIDBILDUNG VON *FUSARIUM AQUAEDUCTUUM*

Von

D. Eberhard, W. Rau und C. Zehender

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Oktober 1960)

Einleitung

Die Färbung zahlreicher Mikroorganismen durch Bildung von Carotinoiden erfolgt meist in völliger Dunkelheit, also unabhängig vom Licht; nur bei wenigen konnte bisher festgestellt werden, daß Licht die Carotinoid-Synthese fördert oder dazu unbedingt notwendig ist. *Phycomyces blakesleeanus* bildet nach Garton, Goodwin u. Lijinsky (1951) und nach Chichester, Wong u. Mackinney (1954) im Licht doppelt soviel Farbstoff wie im Dunkeln; auch bei *Penicillium sclerotiorum* (Mase, Rabourn u. Quakenbush 1957) wirkt das Licht fördernd. Carlile (1956) fand nur in belichteten Kulturen von *Fusarium oxysporum* Carotinoide, ebenso Ishii u. Akagi (1948) bei *Neurospora sitophila*; nach Codner und Platt (1959) bilden 48 Stämme von *Cephalosporium* nur im Licht Carotinoide. Am eingehendsten wurde der Einfluß des Lichts auf die Carotinoidbildung an *Neurospora crassa* untersucht. Nach Haxo (1955) wird bei *Neurospora crassa* im Dunkeln kein Farbstoff gebildet; Zalokar (1954, 1955) fand an konidienfreien Kulturen, daß schon eine Belichtung von 1 min ausreicht, um in anschließender Dunkelheit eine Farbstoffbildung anzuregen. Es sind demnach mindestens 2 Phasen der Carotinoid-Bildung zu unterscheiden: Eine Primärreaktion, in der das Licht einen noch unbekannten „angeregten Zustand" schafft und eine Sekundärreaktion, in der dann auch im Dunkeln die Pigmente gebildet werden. Nach Zalokar (1955) reicht bereits eine Belichtungszeit von 10 min bei einer für *Neurospora crassa* relativ hohen Lichtintensität (14 Watt-Leuchtstoffröhre in 70 cm Abstand) aus, um in der anschließenden Dunkelperiode maximale Farbstoffbildung zu erzielen; bis zu 6 min war die gebildete Carotinoidmenge der Belichtungszeit linear proportional. Bei Versuchen, die die Gültigkeit der Produktenregel prüfen sollten, zeigte sich, daß gleiche Lichtmengen nicht die Bildung gleicher Farbstoffmengen hervorrufen, sondern daß längere Belichtungszeiten bei gleicher Lichtmenge wirksamer sind.

Fusarium aquaeductuum enthält Carotinoide, die ebenfalls nur im Licht gebildet werden (RAU u. ZEHENDER 1959). In der vorliegenden Arbeit wird über die Abhängigkeit der Carotinoidbildung von Lichtintensität und Lichtmenge berichtet.

Material und Methodik

Zu den Versuchen wurde der bereits früher (RAU u. ZEHENDER 1959) erwähnte Stamm von *Fusarium aquaeductuum* verwendet.

Die Anzucht erfolgte in Erlenmeyerkolben mit 3%iger Malzextraktnährlösung auf der Schüttelmaschine bei 22° C und völliger Dunkelheit. Bei Versuchsbeginn waren die Pilze jeweils $2^1/_2$ Tage alt, da nach Vorversuchen in diesem Alter die höchste Ausbeute an Farbstoff (gemessen als Extinktion pro Trockengewicht) erzielt werden konnte.

Die Pilze wurden auf einer Nutsche aus der Nährlösung abfiltriert, mit Aqua dest. mehrmals gewaschen und anschließend in Phosphatpuffer (1/75 mol; p_H 5,6) suspendiert. Je 150 ml dieser Pilzsuspension wurden in Gaswaschflaschen gefüllt und unter dauernder Belüftung zur Farbstoffbildung dem Licht ausgesetzt. Dem Pilz stand also während der Farbstoffsynthese keine Kohlenstoff- und keine Stickstoffquelle im Außenmedium zur Verfügung.

Die Belichtung erfolgte in einem Konstantraum ($20^0 \pm 1/2^0$) mit 3 Leuchtstoffröhren [Osram HNT (2×) und HNW (1×), 65 Watt]; die entsprechenden Lichtintensitäten wurden durch Variieren des Abstands der Gaswaschflaschen von der Lichtquelle hergestellt. Gemessen wurde die Lichtintensität mit einer geeichten Photozelle. Im Dunkeln standen die Pilze ebenfalls in einem Konstantraum von 20°.

Zur Bestimmung der gebildeten Carotinoidmenge wurde der Pilz aus dem Phosphatpuffer abgenutscht und das Mycel mit Hilfe eines Homogenisators nach POTTER u. ELVEHJEM mit Aceton mehrmals extrahiert. Aus dem durch Zentrifugieren geklärten Acetonextrakt wurde der Farbstoff durch Zugabe von Wasser in Petroläther übergetrieben und mit Wasser mehrmals gewaschen. Die Extinktion des in 10 ml Petroläther (Sp. 30—50° C) gelösten Gesamtfarbstoffes wurde in 1 cm-Cuvetten in einem Beckman-Spektralphotometer (Modell B) im Bereich zwischen 450 und 500 mμ im Abstand von 2,5 mμ gemessen; die Meßwerte bei den einzelnen Versuchen bedeuten Extinktion im Absorptionsmaximum.

Jeweils 5 ml der Pilzsuspension wurden zur Trockengewichtsbestimmung in Wägegläschen 24 Std bei 105° und anschließend im Exsiccator über $CaCl_2$ getrocknet. Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach KJELDAHL.

Zu Beginn jedes Versuches, d. h. wenn die Pilze aus der Nährlösung abgenutscht waren, wurde von einer Probe der Farbstoffgehalt bestimmt; der Extrakt war immer praktisch farblos. Auch die bei jedem Versuch mitgeführten Dunkelproben enthielten bei Versuchsende nur Spuren von Carotinoiden. Der geringe Farbstoffgehalt dürfte darauf zurückzuführen sein, daß nicht in vollständiger Dunkelheit gearbeitet werden konnte; die Menge war in jedem Fall sehr gering und damit zu vernachlässigen.

Ergebnisse

1. Der Verlauf der Farbstoffbildung bei verschiedenen Lichtintensitäten. Bei jedem Versuch wurden 10—12 Pilzproben Dauerlicht von

3000, 6000 und 12000 Lux ausgesetzt; nach verschiedenen Zeiten wurden einzelne Proben entnommen und der Farbstoffgehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 zusammengestellt. Bei allen 3 Lichtintensitäten verläuft die Carotinoidbildung gleichsinnig: Bis etwa zur 5. Std steigen die Kurven steil an, nach etwa 8 Std ist bereits die maximale Farbstoffmenge gebildet. Auch bei Fortsetzung der Versuche bis zu 36 Std konnte keine weitere Zu- oder Abnahme der Carotinoide festgestellt werden.

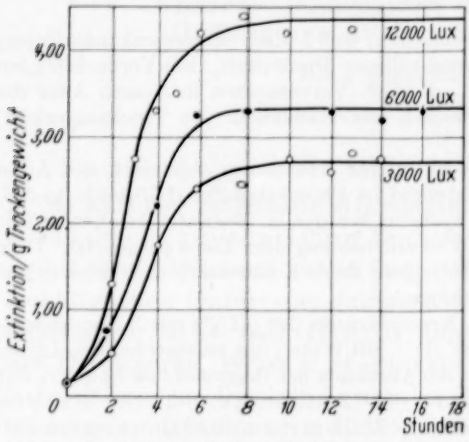


Abb. 1. Verlauf der Farbstoffbildung im Dauerlicht bei verschiedenen Lichtintensitäten

Das Absorptionsmaximum des Gesamtfarbstoffs verschiebt sich im Verlauf der Carotinoidbildung etwas vom kürzer- zum längerwelligen Bereich. Dies deutet darauf hin, daß die einzelnen Carotinoide nicht gleichmäßig schnell gebildet werden, wie das schon Zalokar (1954) für *Neurospora crassa* fand. Untersuchungen darüber sind zur Zeit im Gang.

Da Proben, die mit 3000 oder 6000 Lux belichtet wurden, auch bei längerer Lichteinwirkung nicht die Farbstoffmenge der Proben bei 12000 Lux bilden, scheint die maximal erreichbare Farbstoffmenge von der Lichtintensität abzuhängen. Inwieweit die Carotinoidbildung von der Lichtmenge abhängt, wurde in den folgenden Versuchen untersucht.

2. Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Lichtmenge. Zalokar (1955) und Carlile (1956) hatten gefunden, daß bei *Neurospora crassa* bzw. *Fusarium oxysporum* die Carotinoidbildung nach Belichtung in der daran anschließenden Dunkelheit weiterläuft. Es mußte deshalb zunächst geprüft werden, ob bei *Fusarium aquaeductuum* entsprechende Verhältnisse vorliegen und nach welcher Zeit die Farbstoffbildung abgeschlossen ist.

Zu diesem Zweck wurden Proben bei 20° 1 Std mit 12000 Lux belichtet, anschließend in Dunkelheit gebracht und wie in den vorhergehenden Versuchen der zeitliche Verlauf der Carotinoid-Synthese untersucht.

Das Ergebnis ist in Abb. 2 dargestellt. Wie daraus zu ersehen ist, ist am Ende der Lichtperiode (↓) noch keine nennenswerte Farbstoffbildung festzustellen. Der weitere Verlauf der Kurve entspricht genau den Kurven für die Carotinoid-Synthese unter Dauerlicht; die maximal

erreichbare Farbstoffmenge ist bereits nach 8 Std praktisch vollständig gebildet.

Für die folgenden Versuche wurden deshalb Proben mit 3000, 6000 und 12000 Lux $7^1/_2$ min bis 8 Std lang belichtet und bis zu 24 Std

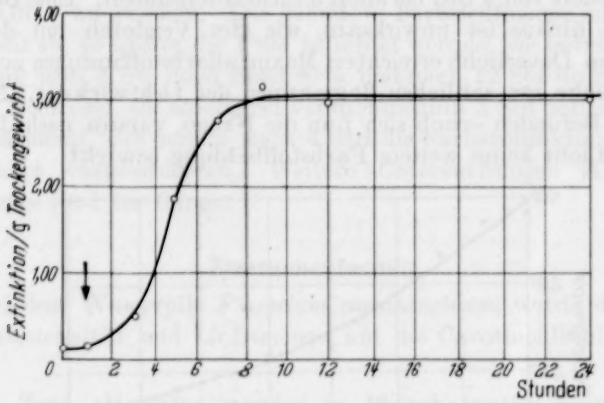


Abb. 2. Verlauf der Farbstoffbildung im Dunkeln nach 1stündiger Belichtung. (Pfeil: Ende der Belichtung)

nach Versuchsbeginn im Dunkeln belassen. Schließlich wurde die Farbstoffmenge bestimmt. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse.

Die in Gruppen zusammengefaßten Säulen repräsentieren Proben, die mit derselben Lichtmenge (Produkt Intensität × Zeit; angegeben

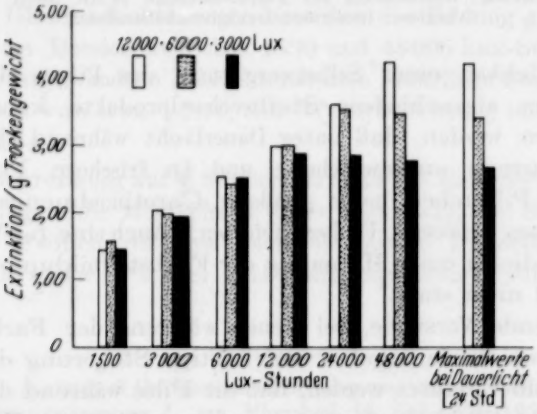


Abb. 3. Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Lichtmenge

in Lux-Stunden) bestrahlt wurden. Sie zeigen, daß im Gegensatz zu den Befunden von ZALOKAR (1955) gleiche Lichtmengen die Bildung gleicher Carotinoid-Mengen bewirken, unabhängig davon, wie das Produkt aus Intensität × Zeit gebildet wurde. Die Abszisse ist in

logarithmischer Teilung gezeichnet; da die gestrichelte Linie, die die 12000 Lux-Säulen miteinander verbindet, eine Gerade ist, ergibt sich, daß die gebildeten Farbstoffmengen dem Logarithmus der Lichtmenge proportional sind. Diese Abhängigkeit gilt allerdings nur bis zu einer Belichtungszeit von 4 Std bei allen 3 Lichtintensitäten. Eine Belichtung über 4 Std hinaus ist unwirksam, wie der Vergleich mit den unter 24stündigem Dauerlicht erreichten Maximalfarbstoffmengen zeigt.

3. Versuche zur zeitlichen Begrenzung der Lichtwirkung. Nach den bisherigen Befunden erhob sich nun die Frage, warum nach der 4. Std gebotenes Licht keine weitere Farbstoffbildung bewirkt.

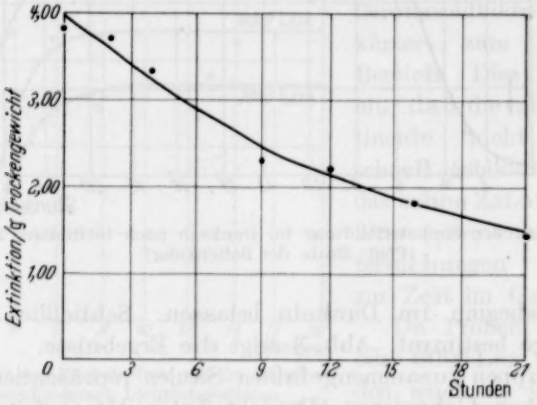


Abb. 4. Farbstoffbildung bei verschieden langer Dunkelvorbehandlung und anschließender 3stündiger Belichtung; Bestimmung der Farbstoffmenge 24 Std nach der Belichtung. (Abszisse: Dauer der Dunkelvorbehandlung)

Die Möglichkeit einer Selbstvergiftung des Pilzes durch in das Außenmedium abgeschiedene Stoffwechselprodukte konnte dadurch ausgeschlossen werden, daß unter Dauerlicht während der Farbstoffbildung mehrmals ausgewaschene und in frischem Phosphatpuffer suspendierte Pilzproben keine größeren Carotinoidmengen als in der gleichen Lösung belassene Proben lieferten. Auch eine p_H-Verschiebung im Medium, die zu einer Hemmung der Farbstoffbildung hätte führen können, fand nicht statt.

Orientierende Versuche, bei denen während der Farbstoffbildung Zucker geboten wurde, ergaben eine kräftige Steigerung derselben. Es konnte deshalb vermutet werden, daß die Pilze während des Versuches an für die Carotinoid-Synthese notwendigen Reservestoffen verarmen. Aus der Tatsache, daß das nach der 4. Std gebotene Licht keine weitere Farbstoffbildung bewirkt, könnte weiterhin geschlossen werden, daß die Verarmung nach 4 Std so weit fortgeschritten ist, daß keine „Vorstufen" für die Carotinoid-Synthese mehr zur Verfügung stehen. Um dies zu prüfen, wurde folgender Versuch angestellt: Die Pilze wurden,

nachdem sie aus der Nährlösung in Phosphatpuffer übertragen worden waren, nicht sofort belichtet, sondern erst verschieden lang im Dunkeln belassen und dann 3 Std mit 12000 Lux belichtet. Die Bestimmung der Farbstoffmenge erfolgte 24 Std nach der Belichtung. Das Ergebnis ist aus Abb. 4 zu ersehen. Die gebildete Farbstoffmenge nimmt zwar um so mehr ab, je später die Pilze belichtet werden, sie beträgt aber bei Belichtung nach 4 Std noch rund 80% und nach 12 Std immerhin etwa 50% der Kontrolle, die sofort bei Versuchsbeginn 3 Std belichtet wurde. Eine Verarmung, die bereits nach 4 Std die Farbstoffbildung limitiert, ist demnach ausgeschlossen. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind im Gange.

Zusammenfassung

1. Bei dem Wasserpilz *Fusarium aquaeductuum* wurde der Einfluß von Lichtintensität und Lichtmenge auf die Carotinoidbildung untersucht.

2. $2^1/_2$ Tage alte Pilze wurden in Phosphatpuffer suspendiert, in Gaswaschflaschen unter ständiger Durchlüftung belichtet und nach verschiedenen Zeiten der Gesamtfarbstoffgehalt bestimmt.

3. Die im Dauerlicht gebildete Farbstoffmenge ist von der Lichtintensität abhängig und erreicht bereits nach etwa 8 Std den höchsten Wert, der sich auch bei längerer Belichtungszeit nicht mehr ändert.

4. Die Farbstoffbildung läuft nach kurzer Belichtung auch im Dunkeln weiter. Gleiche Lichtmengen bewirken die Bildung gleicher Farbstoffmengen im Bereich zwischen 1500 und 48000 Lux-Stunden. Dies gilt bei allen angewandten Lichtintensitäten allerdings nur bis zu einer Belichtungszeit von etwa 4 Std; eine Weiterbelichtung nach der 4. Std ist wirkungslos.

5. Diese Begrenzung auf 4 Std beruht nicht auf einer Selbstvergiftung der Pilze. Gegen die Möglichkeit einer Verarmung an Reservestoffen spricht, daß Proben, die erst nach 4stündiger Dunkelheit belichtet wurden, noch etwa 80% der Farbstoffmenge sofort belichteter Pilze bildeten.

Literatur

Carlile, M. J.: A study of the factors influencing non-genetic variation in a strain of *Fusarium oxysporum*. J. gen. Microbiol. **14**, 643—654 (1956).

Chichester, C. O., P. S. Wong and G. Mackinney: On the biosynthesis of carotenoids. Plant Physiol. **29**, 238—241 (1954).

Codner, R. C., and B. C. Platt: Light-induced production of carotenoid pigments by *Cephalosporia*. Nature (Lond.) **184**, 741 (1959).

Garton, G. A., T. W. Goodwin and W. Lijinsky: General conditions governing β-carotene synthesis by the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. Biochem. J. **48**, 154—163 (1954).

Goodwin, T. W.: Carotenoids. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. X, S. 186—222. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

Haxo, F.: Studies on the carotenoid pigments of *Neurospora* 1. Composition of the pigment. Arch. of Biochem. **20**, 400—421 (1949).

— Some biochemical aspects of fungal carotenoids. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **12**, 169—197 (1955).

Ishii, R., and M. Akagi: *Monilia (Neurospora) sitophila*. Propagation and pigment production. J. Ferment. Technol. (Japan) **26**, 198—203 (1948).

Mase, Y., W. J. Rabourn and F. W. Quakenbush: Carotene production by *Penicillium sclerotiorum*. Arch. Biochem. **68**, 150—156 (1957).

Rau, W., u. C. Zehender: Die Carotinoide von *Fusarium aquaeductuum* Lagh. Arch. Mikrobiol. **32**, 423—428 (1959).

Zalokar, M.: Studies on Biosynthesis of Carotenoids in *Neurospora crassa*. Arch. Biochem. **50**, No 1 (1954).

— Biosynthesis of carotenoids in *Neurospora*. Action spectrum of photoactivation. Arch. Biochem. **56**, No 2 (1955).

Dr. W. Rau und Dr. C. Zehender,
Botanisches Institut der Universität München 19, Menzinger-Str. 67

Planta 56, 309—321 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Bonn

WACHSTUMSINDUKTION UND WUCHSSTOFFMETABOLISMUS IM WEIZENKOLEOPTILZYLINDER

REAKTIONSPRODUKTE DER IES IN ABHÄNGIGKEIT VON DEN INKUBATIONSKONZENTRATIONEN

Von

HANS-DIETER KLÄMBT

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Oktober 1960)

Seitdem pflanzliche Streckungswuchsstoffe in den 20er Jahren nachgewiesen wurden (WENT 1928), ist ihr Wirkungsmechanismus immer wieder Gegenstand von Überlegungen und vieler Hypothesen geworden. Nachdem in den 30er Jahren die chemische Natur des „Heteroauxins" = Indol-3-essigsäure (IES) aufgedeckt wurde, war eine erste stoffliche Voraussetzung für Untersuchungen über die Wuchsstoffwirkung geschaffen. Jedoch erst heute haben wir mit der Entwicklung und Anwendung der Papierchromatographie Aussicht, die aufgestellten Hypothesen auf ihre Richtigkeit zu prüfen, d.h. stoffliche Beweise dafür oder dagegen finden zu können.

In den Arbeiten von ANDREAE u. Mitarb. (1955—1960) und von BENNET-CLARK und WHEELER (1959) werden Indol-3-acetylasparaginsäure (IAAS) und Indol-3-acetamid (IAAM) als Stoffwechselprodukte junger Erbsenpflanzen und Kartoffelscheiben nach IES-Inkubation beschrieben. ANDREAE, GOOD und VAN YSSELSTEIN (1956) konnten beide Substanzen nach entsprechenden Inkubationen in etiolierten Koleoptilen von Mais, Hafer und Gerste, in etiolierten Hypokotylen von Sonnenblumen und Buchweizen, in etiolierten Kartoffelsprossen und in Sproßteilen von Tomaten und Kohlpflanzen nachweisen. Daraus können wir folgern, daß die Fähigkeit zur Kondensation der IES mit NH_3 bzw. der Aminogruppe der Asparaginsäure bei höheren Pflanzen allgemein anzutreffen ist. — Ob diesen Substanzen eine Bedeutung in der Kette der Wachstumsauslösung durch IES zukommt, und welche physiologische Wirksamkeit sie entfalten, ist bisher unbekannt.

In einer kurzen Mitteilung (KLÄMBT 1960a) konnte ich über das Auftreten nachweisbarer Mengen von IAAS in Weizenkoleoptilzylindern in Abhängigkeit von den IES-Konzentrationen der Inkubationslösungen

berichten. Die im Streckungswachstumstest dargebotene IES wird also nicht nur bei der Auslösung des Wachstums verbraucht und in Nebenreaktionen oxydativ abgebaut, sondern sie wird unter anderem auch mit der Aminosäure Asparaginsäure konjugiert. Diese Säureamidbindung stellt eine sehr energiereiche Bindung dar, deren Bildung wahrscheinlich über das Indol-3-acetyl-Co-Enzym A geht (ZENK und LEOPOLD 1958 und ZENK 1960b). Ihre physiologische Wirkung und ihre Bedeutung für die Pflanze ist unbekannt, wenngleich das Auftreten entsprechender Glycinderivate im tierischen Organismus für eine Entgiftungsreaktion spricht.

Material und Methoden

Sämtliche Versuche sind an Weizenkoleoptilzylindern (WKZ) der Sorten „Derenburger Silberweizen" und „Carsten VI" durchgeführt worden. Das Pflanzenmaterial wurde folgendermaßen angezogen: 3 Std Quellen der gebeizten Karyopsen in Leitungswasser und anschließend 24—30 Std Vorkeimen in Petrischalen, Selektion der Karyopsen nach einheitlicher Keimeslänge und Stecken derselben in feuchten Sand. Anschließend wuchsen sie 40—44 Std bei 25° C und 96—100% Luftfeuchtigkeit und ergaben eine sehr einheitliche Koleoptillänge von 15—20 mm. Die Koleoptilen wurden geerntet, 4 mm lange Koleoptilzylinder (3 mm von der Spitze entfernt) herausgeschnitten und direkt in die Inkubationslösung gebracht. Es wurden je 10 WKZ in kleinen Petrischalen (Innendurchmesser 31 mm) in 2 ml Testlösung inkubiert. Zu jeder Testkonzentration gehörten 10 Schalen zu je 10 WKZ = 100 WKZ.

Nach 22stündiger oder kürzerer Inkubation wurden die WKZ photographiert und anschließend nach Abtrennung der Inkubationslösung und gründlicher Waschung unter fließendem Wasser gebrüht, kurz aufgekocht und zermörsert. 22 bis 24 Std wurden sie mit etwa 40 ml Wasser bei Zimmertemperatur extrahiert und nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Glaswollefiltration und Ansäuerung der Extrakte mit HCl auf ungefähr p_H 2,5 mit etwa dem 5fachen Volumen peroxydfreiem Äther ausgeschüttelt (Direkt-Äther). Die saure wäßrige Lösung wurde anschließend mit $NaHCO_3$ bzw. NaOH alkalisch gemacht (Endkonzentration etwa 1 normal) und 1 Std bei 100° C hydrolysiert. Nachfolgend wurden die Hydrolysate wieder auf etwa p_H 2,5 mit HCl angesäuert und erneut mit dem 5fachen Volumen Äther ausgeschüttelt (Hydrolysen-Äther). Die ätherischen Extrakte wurden auf dem Wasserbad eingeengt und quantitativ punktförmig auf Chromatographiepapier (Schleicher und Schüll 2043b) aufgetragen.

Als Lösungsmittel wurde Isopropanol:NH_3 (25%):Wasser (80:15:5) verwendet und damit sowohl aufsteigend als auch absteigend chromatographiert. Zunächst wurden die Chromatogramme mit Ehrlichs Reagens und zum Teil aus Gründen einer sicheren Identifizierung auch mit Salkowskis Reagens besprüht und die Fleckgrößen als Anhaltspunkte für einen halbquantitativen Vergleich benutzt. Bei späteren Versuchen wurden die Flecken parallel zu entwickelten Chromatogrammen blind eluiert (Aqua dest. 12 Std bei 5° C), die Eluate mit Salkowskis Reagens (0,001 m $FeCl_3$ in 14 n H_2SO_4) versetzt und die Extinktion für IES nach 70 min, für IAAS nach 120 min bei einer Wellenlänge von 535 mμ bzw. 555 mμ im Zeiss-Spektrophotometer PMQ II gemessen.

IES wurde als freie Säure (Merck-Präparat 353) verwendet. Andere notwendige Vergleichs- und Testsubstanzen habe ich selbst hergestellt. Indol-3-acetyl-1-

asparaginsäure (IAAS) wurde über das gemischte Anhydrid der IES[1] erhalten (in Anlehnung an WIELAND und HÖRLEIN 1955). Trotz großer Bemühungen ist es mir nicht gelungen, die IAAS kristallin zu gewinnen. Ich habe sie daher über die Alkoholfällung des Ba-Salzes gereinigt und für Testzwecke Ba^{++} als $BaSO_4$ gefällt. Dafür wurden nur chromatographisch reine Präparate verwendet. Malonyltryptophan, das ich durch Einwirken von Malonsäuremonochlorid auf Tryptophan in NaOH-alkalischer Lösung erhalten habe, wurde in gleicher Weise als Ba-Salz gereinigt. Zur Darstellung des Indol-3-acetamids (IAAM) ging ich auch von dem gemischten Anhydrid der IES aus und gab NH_3 im Überschuß dazu. Schließlich wurde es zur Reinigung aus heißem Wasser umkristallisiert.

Ergebnisse

1. IES-Inkubationsversuche. Zunächst war es notwendig, einen Einblick in den IES-Stoffwechsel der Koleoptilzylinder in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsreaktion zu erhalten. ANDREAE u. Mitarb. (1956) hatten nur gezeigt, daß Gramineenkoleoptilen bei einer IES-Inkubation von ungefähr $1{,}7 \cdot 10^{-4}$ m IAAM und IAAS bildeten. Vom wuchsstoffphysiologischen Standpunkt aus ist diese Konzentration bereits so hoch, daß hierbei schon ungefähr das Wachstumsmaximum der WKZ erreicht wird. Abb. 1 zeigt eine IES-abhängige Wachstumskurve der WKZ.

Abb. 2 ist ein mit EHRLICHS Reagens entwickeltes Chromatogramm der Ätherextrakte von je 100 WKZ nach verschiedenen Inkubationen vor und nach n $NaHCO_3$-Hydrolyse. Die Daten der Abb. 1 und 2 stammen von einem Versuchsansatz. Es ist bemerkenswert, daß bis zum maximalen Wachstum der Koleoptilzylinder weder IES noch IAAS in den WKZ nachweisbar waren. Auch die entsprechenden Inkubationslösungen enthielten keine IES mehr. Mit zunehmender IES-Konzentration der Inkubationslösungen war IES sowohl in den Geweben als auch im Außenmedium nachweisbar. IAAS konnte in den WKZ nach $6 \cdot 10^{-4}$ m IES-Inkubation gefunden werden. In dem hier vorliegenden Versuch (Abb. 1 und 2) trat bei Inkubation in $6 \cdot 10^{-3}$ m IES eine nur 25%ige Hemmung des WKZ-Wachstums gegenüber der Kontrolle auf. Hierbei ist eine Zunahme der nachweisbaren IAAS-Mengen in den WKZ gegenüber jenen bei $6 \cdot 10^{-4}$ m IES-Inkubation festzustellen. Neben IES und IAAS sind vor allem bei überoptimalen IES-Gaben zusätzlich auch andere IES-Derivate nachweisbar. So läßt sich IAAM und wahrscheinlich das 2-Hydroxy-IAAM nur in den WKZ der höchsten, toxisch wirkenden IES-Konzentration auffinden. 2-Hydroxy-IES (KLÄMBT 1959) und Indol-3-carbonsäure (ICS) sind jedoch zum Teil auch bei niederen IES-Konzentrationen in den WKZ nachweisbar. Während wir die ICS als ein Oxydationsprodukt der IES, entstanden durch Einwirkung der IES-Oxydase, kennen, ist die Art der Oxydation in der 2er-Stellung des Indolkerns, die zur 2-Hydroxy-IES und mutmaßlich zum

[1] Für den dafür verwendeten Chlorameisensäureisobutylester sowie für manche Beratung danke ich auch an dieser Stelle Herrn Dr. J. ULLRICH, Chemisches Institut Bonn.

2-Hydroxy-IAAM führt, unbekannt. Sie könnte nach Art der β-Oxydation verlaufen. — Da noch keine Reinsubstanz zur Verfügung steht (sie wurde mir jedoch in Aussicht gestellt), ist ihre physiologische Wirkung und Bedeutung noch unbekannt. Die IAAM-Bildung, die in meinen Versuchen nur bei Anwendung toxisch wirkender Konzentrationen auftrat, stellt sicher nur eine unbedeutende Nebenreaktion dar, die durch

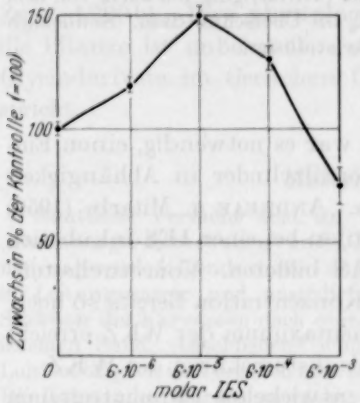


Abb. 1. Kurve der Abhängigkeit des WKZ-Wachstums von der IES-Konzentration. Mittelwerte aus je 100 Einzelmessungen $\pm F_m$

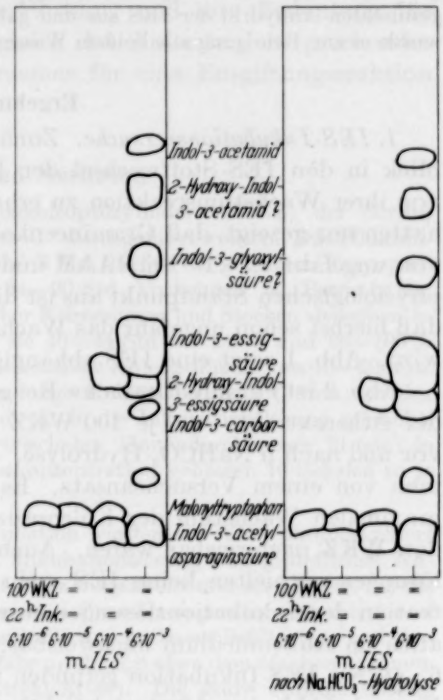


Abb. 2. Chromatogramme der Ätherextrakte vor und nach Hydrolyse von je 100 WKZ nach IES-Inkubation. Versuchsansatz vom 22. April 1960

ausreichende Belüftung der Versuchsansätze zurückzudrängen ist oder ganz fehlen kann.

Ein weiteres Indolderivat, das in den WKZ bei allen IES-Außenkonzentrationen (eventuell ausschließlich der höchsten) in gleicher Menge nachweisbar war, ist Malonyltryptophan (GOOD und ANDREAE 1957). Fehlte es, wie gesagt, bei den höchsten IES-Stufen, so war es in das Außenmedium ausgetreten und konnte auf den Chromatogrammen der Inkubationslösungen aufgedeckt werden. Welche Bedeutung dem Malonyltryptophan zukommt, ist völlig unbekannt. Da seine Konzentration vom IES-Gehalt der Inkubationslösung nicht beeinflußt wird, ist es sicher, daß Malonyltryptophan keine IES-Vorstufe im eigentlichen Sinne darstellt.

In den folgenden Versuchen wurden von den auftretenden Indolderivaten allein IES und IAAS spektrophotometrisch gemessen. Wäh-

rend diese Bestimmungen auf dem Wege der chromatographischen Trennung mit nachfolgender blinder Eluation erfolgten, wurden die Inkubationslösungen direkt auf ihren IES-Gehalt getestet. Tabelle 1 zeigt die Meßdaten.

Tabelle 1. *Mittelwerte* $\pm F_m$ *des WKZ-Wachstums, Anfangs- und End-IES-Konzentrationen der Inkubationslösungen und IES und IAAS-Gehalt des Koleoptilgewebes nach 22stündiger IES-Inkubation*

Anfangskonzentration der Inkubationslösung m IES	Zuwachs der WKZ in mm $\overline{\Delta x} \pm m_{\overline{\Delta x}}$	Endkonzentration der Inkubationslösung m IES	je 100 Weizenkoleoptilzylinder . Mol IES		Mol IAAS		
			direkt	nach Hydrolyse	direkt	nach Hydrolyse	direkt + Hydrolyse
0	2,49 ± 0,069	—	—	—	—	—	—
	2,78 ± 0,063	—	—	—	—	—	—
	2,84 ± 0,068	—	—	—	—	—	—
6×10^{-6}	3,45 ± 0,083	—	—	—	—	—	—
	3,20 ± 0,090	—	—	—	—	—	—
	3,90 ± 0,088	—	—	—	—	—	—
6×10^{-5}	4,20 ± 0,075	—	—	—	—	—	—
	3,64 ± 0,076	—	—	—	—	—	—
	4,15 ± 0,087	—	—	—	—	—	—
6×10^{-4}	4,30 ± 0,093	$3{,}2 \times 10^{-5}$	$7{,}1 \times 10^{-8}$	$3{,}1 \times 10^{-7}$	$4{,}0 \times 10^{-7}$	$1{,}5 \times 10^{-7}$	$5{,}5 \times 10^{-7}$
	4,22 ± 0,130	$2{,}8 \times 10^{-5}$	$2{,}7 \times 10^{-8}$	$3{,}3 \times 10^{-7}$	$3{,}1 \times 10^{-7}$	$1{,}5 \times 10^{-7}$	$4{,}6 \times 10^{-7}$
	4,26 ± 0,094	$1{,}7 \times 10^{-5}$	$4{,}6 \times 10^{-8}$	$3{,}7 \times 10^{-7}$	$2{,}8 \times 10^{-7}$	$1{,}8 \times 10^{-7}$	$4{,}6 \times 10^{-7}$
3×10^{-3}	0,70 ± 0,050	$2{,}3 \times 10^{-3}$	$4{,}7 \times 10^{-7}$	$5{,}2 \times 10^{-7}$	$5{,}9 \times 10^{-8}$	$5{,}9 \times 10^{-8}$	$1{,}2 \times 10^{-7}$
	0,65 ± 0,035	$2{,}8 \times 10^{-3}$	$4{,}5 \times 10^{-7}$	$4{,}8 \times 10^{-7}$	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$\sim 10^{-8}$
	0,66 ± 0,051	$2{,}3 \times 10^{-3}$	$5{,}8 \times 10^{-7}$	$7{,}3 \times 10^{-7}$	$5{,}0 \times 10^{-8}$	$3{,}4 \times 10^{-8}$	$8{,}4 \times 10^{-8}$
6×10^{-3}	0,27 ± 0,013	$3{,}7 \times 10^{-3}$	$1{,}0 \times 10^{-6}$	$2{,}2 \times 10^{-7}$	—	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$
	0,27 ± 0,015	$4{,}5 \times 10^{-3}$	fehlt	$9{,}4 \times 10^{-8}$	—	—	—
	0,12 ± 0,016	$4{,}9 \times 10^{-3}$	$1{,}4 \times 10^{-6}$	$1{,}8 \times 10^{-7}$	—	—	—

Untersuchungen über den quantitativen Erfolg der Ätherausschüttelungen ergaben unter den vorliegenden Bedingungen für IES einen zufriedenstellenden und ausreichenden Grad von Zuverlässigkeit. IAAS wurde jedoch bei der Direkt-Ätherausschüttelung nur zu 60—80% erfaßt, so daß die IAAS-Mengen, die ich nach Hydrolyse noch nachweisen konnte, wahrscheinlich nicht hydrolytisch gebildet worden waren, sondern durch die unvollständige 1. Ätherextraktion bedingt sind. Um ein genaues Bild zu erhalten, müssen wir daher die IAAS-Mengen — direkt und nach Hydrolyse erhalten — addieren, was in der letzten Spalte der Tabellen erfolgt ist.

Besonders deutlich ist die Bestätigung der chromatographischen Ergebnisse (Abb. 2), daß die WKZ nach einer Inkubation in $6 \cdot 10^{-5}$ m IES keine IES und keines ihrer Derivate, weder in der Inkubationslösung noch im Gewebe enthalten. Wir müssen also folgern, daß nach

den verstrichenen 22 Std jeder IES-„Vorrat" für das Wachstum aufgebraucht wurde. Auf welchem Wege dieser Verbrauch erfolgt, ist uns nach wie vor unbekannt. Daß er mit der eigentlichen Wachstumsauslösung in einer näheren Verbindung steht, muß angenommen werden.

Bei einer IES-Außenkonzentration von $6 \cdot 10^{-4}$ m und darüber wird die dargebotene IES nicht verbraucht und ist folglich in der Inkubationslösung und in den WKZ nachweisbar. Hierbei fällt auf, und das ist bei der $6 \cdot 10^{-4}$ m IES-Inkubation am deutlichsten, daß aus den WKZ eine größere

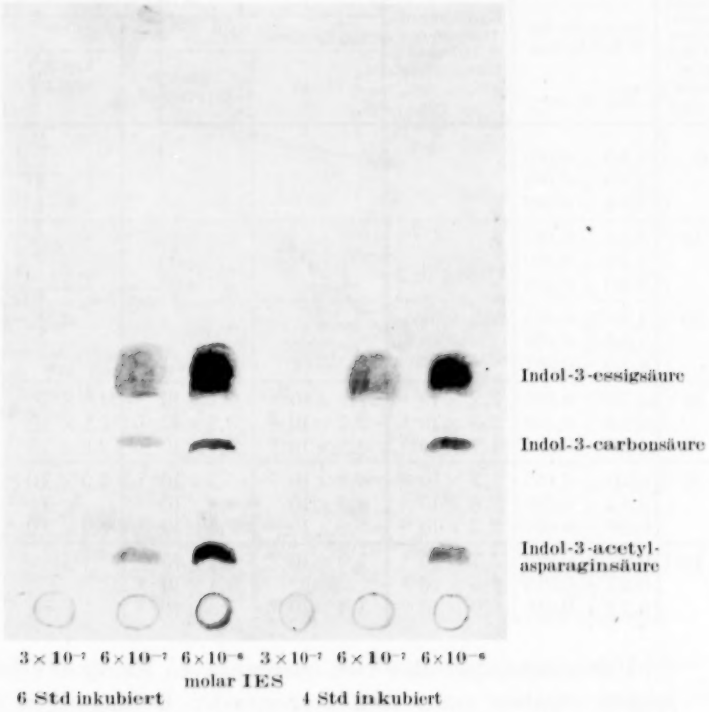


Abb. 3. Autoradiogramm der Ätherextrakte aus je 50 WKZ nach 4- und 6stündiger IES-Inkubation

IES-Menge erst hydrolytisch freigesetzt wird. Im wäßrigen Extrakt müssen also eine oder mehrere Substanzen vorliegen, die IES in leicht spaltbaren Bindungen (Esterbindungen) enthalten. Da z. B. Esterbindungen für ihre Bildung keiner besonderen Energie bedürfen, ist es nicht weiter verwunderlich, daß diese Art der „gebundenen IES" im Gegensatz zur IAAS auch noch bei den höchsten, toxisch wirkenden IES-Konzentrationen in den WKZ auftritt. Der IAAS-Gehalt ist bei der $6 \cdot 10^{-4}$ m IES-Inkubation am größten und fällt mit Erhöhung der Außenkonzentration stark ab. Dieses Ergebnis scheint jenem der Abb. 2

zu widersprechen. Während wir dort aber eine nur sehr geringe Wachstumsdepression der WKZ nach Inkubation in $6 \cdot 10^{-3}$ m IES beobachten konnten, ist der Zuwachs der WKZ bei der gleichen Konzentration in den vorliegenden Versuchen gleich Null. Je nach der Wachstumsdepression bei überhohen IES-Konzentrationen, die besonders jahreszeitlich verschieden ist, wird mehr, weniger oder gar keine IAAS in dem Gewebe gebildet. Die IAAS-Bildung setzt folglich ein voll intaktes Gewebe voraus.

Was das Auftreten der IAAS in WKZ nach Inkubation in niederen IES-Konzentrationen betrifft, so haben Versuche mit radioaktiv markierter Indol-3-essigsäure 2 ^{14}C ihre Bildung in WKZ selbst bei einer $6 \cdot 10^{-7}$ m IES-Inkubationslösung erkennen lassen (Abb. 3). Entgegen den Erfahrungen von Bennet-Clark (Brauner und Appel 1960) besitzt die hier verwendete methyl-^{14}C-markierte Indol-3-essigsäure volle Wuchsstoffaktivität und keine bemerkenswert geringere Stabilität als nichtmarkierte IES. Dabei ist das verwendete Präparat mit einer spezifischen Aktivität von 3,82 mc/mM (CFA. 202, Radiochemical Centre, Amersham, England) relativ strahlungsaktiv.

Tabelle 2. *Mittelwerte* $\pm F_m$ *des WKZ-Wachstums, End-IES-Konzentrationen der Inkubationslösungen und IES- und IAAS-Gehalt des Koleoptilgewebes nach verschieden langen Inkubationen in* $1{,}2 \times 10^{-4}$ *m IES*

Inkubationsdauer Std	Zuwachs der WKZ in mm $\overline{\Delta x} \pm m_{\overline{\Delta x}}$	Endkonzentration der Inkubationslösung m IES	je 100 Weizenkoleoptilzylinder				
			Mol IES		Mol IAAS		
			direkt	nach Hydrolyse	direkt	nach Hydrolyse	direkt + Hydrolyse
2	$0{,}39 \pm 0{,}010$	$7{,}0 \times 10^{-5}$	$2{,}0 \times 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	—	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$
4	$0{,}83 \pm 0{,}023$	$5{,}9 \times 10^{-5}$	$2{,}6 \times 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$1{,}2 \times 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$2{,}0 \times 10^{-8}$
8	$1{,}78 \pm 0{,}043$	$6{,}9 \times 10^{-5}$	$< 10^{-8}$	10^{-8}	$2{,}9 \times 10^{-8}$	$1{,}5 \times 10^{-8}$	$4{,}4 \times 10^{-8}$
12	$2{,}48 \pm 0{,}082$	$4{,}2 \times 10^{-5}$	10^{-8}	$2{,}1 \times 10^{-8}$	$5{,}0 \times 10^{-8}$	$2{,}5 \times 10^{-8}$	$7{,}5 \times 10^{-8}$
16	$2{,}81 \pm 0{,}070$	$2{,}0 \times 10^{-5}$	—	$< 10^{-8}$	$3{,}1 \times 10^{-8}$	$2{,}1 \times 10^{-8}$	$5{,}2 \times 10^{-8}$
20	fehlt	fehlt	—	—	$4{,}3 \times 10^{-8}$	$1{,}7 \times 10^{-8}$	$6{,}0 \times 10^{-8}$

Tabelle 2 gibt einen Versuch wieder, der den zeitlichen Wechsel von IES und IAAS bei einer IES-Inkubation von $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ m erkennen läßt. Es handelt sich jeweils um parallele Ansätze. Dabei wird das Maximum der freien IES nach 4 Std, das der estergebundenen IES nach 12 Std und das der asparaginsäuregebundenen IES (IAAS) ebenfalls nach 12 Std erreicht. $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ m IES ergibt ein optimales WKZ-Wachstum, was aus der Tabelle 1 hervorgeht. In der letzten Wachstumsphase ist also allein IAAS noch nachweisbar und reguliert scheinbar das WKZ-Wachstum. Die untere Nachweisgrenze der hier angewendeten Methode liegt jedoch bei etwa 10^{-10} m IES je WKZ. IES wirkt aber bei einer Inkubationslösung von $6 \cdot 10^{-7}$ m mit ungefähr 10^{-12} m IES je WKZ noch

deutlich auf sein Wachstum. Das besagt, daß meine Nachweismethode um zwei Zehnerpotenzen zu unempfindlich oder mein Material viel zu klein ist, um IES in noch wachstumswirksamen Konzentrationen messen zu können. Hierin liegt auch die Schwierigkeit für eine erfolgreiche Untersuchung des Streckungswachstumsmechanismus. Nur die Anwendung von ^{14}C-markierten Wuchsstoffen kann uns diesem Problem näherführen.

2. IAAS-Inkubationsversuche. Nachdem mit Sicherheit der Nachweis von IAAS in WKZ nach Inkubation in IES-Lösung erbracht wurde, ist es interessant und notwendig, die IAAS in Inkubationsversuchen zu testen und etwa auftretende weitere Reaktionsprodukte zu erfassen.

Tabelle 3. *Mittelwerte* $\pm F_m$ *des WKZ-Wachstums, Anfangs- und End-IES-Konzentrationen der Inkubationslösungen und IES und IAAS-Gehalt des Koleoptilgewebes nach 22stündiger IAAS-Inkubation*

Anfangskonzentration der Inkubationslösung m IAAS	Zuwachs der WKZ in mm $\overline{\Delta x} \pm m_{\overline{\Delta x}}$	Endkonzentration der Inkubationslösung m IAAS	je 100 Weizenkoleoptilzylinder*				
			Mol IES		Mol IAAS		
			direkt	nach Hydrolyse	direkt	nach Hydrolyse	direkt + Hydrolyse
0	2,98 ± 0,056	—	—	—	—	—	—
	2,69 ± 0,064	—	—	—	—	—	—
6×10^{-6}	4,15 ± 0,046	—	—	—	—	—	—
	4,11 ± 0,075	—	—	—	—	—	—
6×10^{-5}	4,81 ± 0,069	—	—	—	—	—	—
	3,97 ± 0,091	$2,7 \times 10^{-5}$	—	—	—	—	—
6×10^{-4}	5,28 ± 0,063	$5,3 \times 10^{-4}$	—	—	$2,2 \times 10^{-7}$	$3,7 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-7}$
	4,02 ± 0,089	$4,0 \times 10^{-4}$	—	—	$8,0 \times 10^{-8}$	—	$8,0 \times 10^{-8}$
3×10^{-3}	5,74 ± 0,062	$2,7 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-8}$	—	$1,2 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$
	4,23 ± 0,108	$2,7 \times 10^{-3}$	$\sim 10^{-8}$	—	$8,6 \times 10^{-7}$	$5,1 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-6}$
6×10^{-3}	5,34 ± 0,054	$5,2 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-8}$	—	$1,9 \times 10^{-6}$	$5,9 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$
	4,08 ± 0,085	$5,1 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-8}$	—	$2,3 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-6}$

Tabelle 3 enthält die Meßdaten für das WKZ-Wachstum, für die IAAS-Konzentrationen der Inkubationslösungen und für die Mol-Mengen an IES und IAAS in den WKZ nach 22stündiger Inkubation. Zwei Fakten sind erstaunlich: 1. Es tritt keine eigentliche Wachstumshemmung auf. Das Wachstumsmaximum liegt bei $3 \cdot 10^{-3}$ m IAAS, und die $6 \cdot 10^{-3}$ m Konzentration bewirkt ein nur etwas schwächeres Wachstum. 2. Es lassen sich keine anderen IES-Derivate nachweisen, und IES selbst tritt nicht oder, bei den höchsten IAAS-Konzentrationen, nur in Spuren auf. Dabei muß ich auf die schon oben ausgeführte, relative Unempfindlichkeit der verwendeten Nachweismethode hinweisen. Im Gegensatz zur IES wirkt ihr Konjugationsprodukt mit Asparaginsäure niemals

toxisch. Wie die IES wird auch die IAAS im Gewebe akkumuliert. Da die Meßdaten jenen der Außenkonzentrationen mehr oder weniger entsprechen, kann angenommen werden, daß es sich bei der Akkumulation um einen passiven, physikalischen Vorgang handelt und nicht um einen aktiven, wie er für Erbsenwurzeln nachgewiesen wurde (ANDREAE und VAN YSSELSTEIN 1960a, 1960b).

Diskussion

Die vorliegende Arbeit versucht, einen Einblick in die Bedingungen der Wachstumsinduktion und den Wuchsstoffmetabolismus zu gewinnen. Nachdem IES (= Heteroauxin) bereits über 25 Jahre in ihrer chemischen Struktur bekannt ist und ihre Wirkung auf die verschiedensten Testobjekte immer wieder zu Vergleichszwecken und zu halbquantitativen Aussagen herangezogen wurde und wird, ist es erstaunlich, daß bisher keine Untersuchungen über den Verbleib und die stofflichen Veränderungen der IES in Abhängigkeit vom Wachstumserfolg bekannt geworden sind.

Die Arbeit von ANDREAE und GOOD (1955) hat der Wuchsstoffforschung einen neuen Aufschwung gegeben. Sie haben die IAAS identifiziert und beschrieben, die nach IES-Inkubation in verschiedenen Pflanzen und Organen gebildet wird. Damit ist sicher nicht das für das Wachstum *entscheidende* Reaktionsprodukt der IES aufgedeckt worden, aber immerhin ist IAAS eine hochinteressante Substanz, die, wie inzwischen nachgewiesen wurde (KLÄMBT 1960b), auch natürlich vorkommt.

In den WKZ tritt die IAAS nach Inkubation in IES-Konzentrationen hinab bis $6 \cdot 10^{-7}$ m auf. Toxisch wirkende Konzentrationen von IES ($3 \cdot 10^{-3}$ m und $6 \cdot 10^{-3}$ m) unterbinden die IAAS-Bildung. Das verwundert nicht, da IAAS eine energiereiche Säure-Amid-Bindung besitzt, deren Bildung höchstwahrscheinlich über das Co-Enzym A verläuft (ZENK und LEOPOLD 1958, ZENK 1960b). Durch IAAS-Inkubationen wird gleich starkes und selbst stärkeres Wachstum der WKZ als in IES ausgelöst, ohne daß es im höchsten Konzentrationsbereich zu einer Hemmung kommt. Außerdem läßt sich so gut wie keine freie IES in den WKZ nachweisen. Diese Tatsachen deuten zwei Möglichkeiten einer Einflußnahme der IES auf das Streckungswachstum an.

1. Die IES wirkt direkt oder in einer nur von ihr selbst ausgehenden Reaktion auf den Wachstumsprozeß ein. Die IAAS-Bildung entspräche in diesem Fall einer Entgiftungsreaktion, die überschüssige IES eliminiert. Sie hätte obendrein eine wachstumsregulierende Funktion durch die Bildung eines Reservoirs, aus dem immer nur geringe IES-Mengen freigegeben werden.

2. Die IAAS ist direkt oder über eine von ihr ausgehenden Reaktion im Wachstumsprozeß wirksam.

Die Vorstellung einer IES-Eiweißbindung (HANSCH u. Mitarb. 1951, SIEGEL und GALSTON 1953) und die einer IES-Enzymbindung (NEWCOMB 1951 in VAN OVERBEEK 1952) zusammen mit den dargestellten Ergebnissen ließen mich anfänglich (KLÄMBT 1960a) die zweite Deutungsmöglichkeit als die wahrscheinlichere annehmen. Die Tatsache aber, daß nicht nur synthetische Streckungswuchsstoffe entsprechende Asparaginsäure-Konjugationsprodukte bilden (ANDREAE und GOOD 1957, ZENK 1960a), sondern auch unter anderem Benzoesäure, die keine Wuchsstoffaktivität besitzt, deutet mehr in die Richtung einer Entgiftungsreaktion. Das besagt, daß jede IAAS-Bildung auf einen Überschuß an IES zurückzuführen ist. Wenn nun die WKZ bei einer so geringen Konzentration wie $6 \cdot 10^{-7}$ m IES noch IAAS bilden, so ist diese IES-Konzentration für die Wachstumsinduktion bereits überoptimal.

Die erste Deutung würde erfordern, daß IAAS ständig IES in sehr geringen Mengen freisetzt bzw. daß das Gleichgewicht der Reaktion IES + Asparaginsäure $\rightleftharpoons$ IAAS weitgehend zum Konjugationsprodukt verschoben ist. ZENK (1960a) konnte bei Inkubationsversuchen mit Acetyl-1^{14}C-markierter α-Naphthylacetylasparaginsäure in Erbsenepikotylen nachweisbare Mengen freier α-Naphthylessigsäure 1^{14}C erhalten. Entsprechende Versuche mit ^{14}C-markierter IAAS fehlen noch, doch kann grundsätzlich ein gleiches Ergebnis erwartet werden. Bei sehr hohen IAAS-Konzentrationen habe ich IES-Spuren selbst mit dem sehr unempfindlichen Farbtest messen können.

Neben der IAAS treten bei IES-Inkubationen regelmäßig ein oder mehrere ätherunlösliche IES-Reaktionsprodukte auf, die sich durch n NaOH (1 Std bei 100° C) leicht hydrolysieren lassen. Um welche Art von Substanzen es sich dabei handelt, ist noch unklar, doch kann als ziemlich sicher angenommen werden, daß es sich dabei um Ester der IES handeln muß. Dafür spricht auch der Nachweis hydrolytisch abspaltbarer IES aus WKZ-Extrakten nach Inkubation in den höchsten Konzentrationen. Nach der Erfahrung, daß IAAS erst durch 7 n NaOH zu IES und Asparaginsäure hydrolysiert wird (vgl. dazu auch BENNET-CLARK und WHEELER 1959), ist es sehr unwahrscheinlich, daß n NaOH in 1 Std bei 100° C Säure-Amid-Bindungen hydrolysiert, so daß peptidisch gebundene IES nicht in Betracht kommt.

Die vorliegenden Versuche stellen auch einen Beitrag zur Deutung der Hemmung des Wachstums im überkonzentrierten IES-Bereich dar. Nachdem ein spezifischer Hemmstoff bis heute nicht gefunden wurde, der auf hohe IES-Gaben gebildet werden sollte (SNOW 1937), und der schwach hemmende Einfluß der bei höchsten IES-Konzentrationen auf-

tretenden IES-Abbauprodukte meines Erachtens noch nicht auf eine toxische Wirkung schließen läßt, könnte der Effekt anhand der vorliegenden Ergebnisse auf Begleiterscheinungen der Entgiftungsreaktion zurückgeführt werden. Die IAAS-Bildung aus IES und Asparaginsäure ist ATP-abhängig (Zenk 1960b); dies bedeutet, daß bei IES-Überkonzentrationen die Entgiftungsreaktion viel Energie verbraucht und daß daher die zur Energieerhaltung notwendigen Phosphorylierungen nicht im erforderlichen Umfang durchgeführt werden können. Andererseits wird für die Entgiftungsreaktion Co-Enzym A benötigt, das bei den hemmenden IES-Konzentrationen weitgehend blockiert sein könnte. Bei IAAS-Inkubationen ist ein Vorrat energiereicher IES-Bindung (das Entgiftungsprodukt) verfügbar, so daß der Energiehaushalt der Testpflanze und das Co-Enzym A nicht beansprucht werden. Diese Situation macht die nur fördernde Wirkung der IAAS gut verständlich.

Zusammenfassung

1. Nach 22stündiger Inkubation von Weizenkoleoptilzylindern in Indol-3-essigsäure treten im Gewebe konzentrationsabhängig auf: Indol-3-acetamid, vermutlich 2-Hydroxy-indol-3-acetamid und Indol-3-glyoxylsäure, Indol-3-essigsäure, 2-Hydroxy-indol-3-essigsäure, Indol-3-carbonsäure und Indol-3-acetylasparaginsäure.

2. Malonyltryptophan ist in den Weizenkoleoptilzylindern enthalten und verändert seine Konzentration während der Versuche nicht. Seine Bedeutung ist unbekannt.

3. Nach Inkubation in Indol-3-essigsäure und in Indol-3-acetylasparaginsäure wurde der Gehalt an Indol-3-essigsäure und Indol-3-acetylasparaginsäure vor und nach n NaOH-Hydrolyse spektrophotometrisch gemessen.

4. Die stärkste Bildung von Indol-3-acetylasparaginsäure nach Indol-3-essigsäure-Inkubation wurde knapp unterhalb der bereits toxisch wirkenden Indol-3-essigsäure-Konzentration erhalten. Nach Indol-3-essigsäure-Inkubation ließen sich durch n NaOH-Hydrolyse relativ große Mengen ätherunlöslicher, Indol-3-essigsäure enthaltender Substanzen nachweisen. Dabei muß es sich um estergebundene Indol-3-essigsäure handeln.

5. Indol-3-acetylasparaginsäure-Inkubationen bewirken nur Wachstumsförderung.

6. Nach Indol-3-acetylasparaginsäure-Inkubationen in niederen und mittleren Konzentrationsstufen ist keine IES nachweisbar; bei den höchsten Konzentrationen treten nur Spuren davon auf.

7. Es werden zwei Möglichkeiten der Bedeutung der Indol-3-acetylasparaginsäure-Bildung diskutiert: a) eine Entgiftungsreaktion und

Regulation des Indol-3-essigsäure-abhängigen Wachstums, b) eine direkte Wirkung auf das Wachstum, wobei der ersten Deutung der Vorrang gegeben wird.

8. Die Hemmwirkung überhoher Indol-3-essigsäure-Konzentrationen wird als Begleiterscheinung der Entgiftungsreaktion gedeutet: a) Energiedefizit, b) Co-Enzym-A-Blockierung.

Fräulein INGRID BLECHSCHMIDT danke ich für ihre zuverlässige Arbeit. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat diese Arbeiten mit Sachbeihilfen unterstützt, ihr gilt mein besonderer Dank.

Literatur

ANDREAE, W. A., and N. E. GOOD: The formation of indoleacetylaspartic acid in pea seedlings. Plant Physiol. **30**, 380—382 (1955).

— — Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. IV. Conjugation with aspartic acid and ammonia as processes in the metabolism of carboxylic acids. Plant Physiol. **32**, 566—572 (1957).

—, and M. W. H. VAN YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. III. The uptake of 3-indoleacetic acid by pea epicotyls and its conversion to 3-indoleacetylaspartic acid. Plant Physiol. **31**, 235—240 (1956).

— — Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. V. Effect of calcium ions on 3-indoleacetic acid uptake and metabolism by pea roots. Plant Physiol. **35**, 220—224 (1960).

— — Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. VI. 3-indoleacetic acid uptake and metabolism by pea roots and epicotyls. Plant Physiol. **35**, 225—232 (1960).

BENNET-CLARK, T. A., and A. W. WHEELER: The metabolism of 3-indolylacetic acid in plant tissues. J. exp. Bot. **10**, 468—479 (1959).

BRAUNER, L., u. E. APPEL: Zum Problem der Wuchsstoff-Querverschiebung bei der geotropischen Induktion. Planta (Berl.) **55**, 226—234 (1960).

GOOD, N. E., and W. A. ANDREAE: Malonyltryptophan in higher plants. Plant Physiol. **32**, 561—566 (1957).

—, and M. W. H. VAN YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. II. Some products of the metabolism of exogenous indoleacetic acid in plant tissues. Plant Physiol. **31**, 231—235 (1956).

HANSCH, C., R. M. MUIR and R. JR. METZENBERG: Further evidence for a chemical reaction between plant growth-regulators and a plant substrate. Plant Physiol. **26**, 812—821 (1951).

KLÄMBT, H. D.: Die 2-Hydroxy-Indol-3-essigsäure, ein pflanzliches Indolderivat. Naturwissenschaften **46**, 649 (1959).

— Wuchsstoffhaushalt von IES-induzierten Weizenkoleoptilzylindern. Vortrag auf der Tagg der Dtsch. Bot. Ges., Köln, 1960a.

— Indol-3-acetylasparaginsäure, ein natürlich vorkommendes Indolderivat. Naturwissenschaften **47**, 398 (1960b).

OVERBEEK, J. VAN: Agricultural application of growth regulators and their physiological basis. Ann. Rev. Plant Physiol. **3**, 90 (1952).

SIEGEL, S. M., and A. W. GALSTON: Experimental coupling of indoleacetic acid to pea root protein in vivo and in vitro. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 1111—1118 (1953).

SNOW, R.: On the nature of correlation inhibition. New Phytologist **36**, 283—300 (1937).

WENT, F. W.: Wuchsstoff und Wachstum. Rec. Trav. bot. néerl. **25**, 1—116 (1928).
WIELAND, TH., u. G. HÖRLEIN: Synthese einiger β-Indolacetyl-aminosäuren und -peptide. Justus Liebigs Ann. Chem. **191**, 192—199 (1955).
ZENK, M. H.: Über den Stoffwechsel von Naphthylessigsäure in höheren Pflanzen. Vortrag auf der Tagg der Dtsch. Bot. Ges., Köln, 1960a.
— Enzymatische Aktivierung von Auxinen und ihre Konjugierung mit Glycin. Z. Naturforsch. **15b**, 436—441 (1960b).
—, and A. C. LEOPOLD: Activation of auxins preceding conjugation with amino acids. Plant Physiol. **33**, III (1958).

Dr. HANS-DIETER KLÄMBT, Botanisches Institut der Universität, Bonn a. Rh., Meckenheimer Allee 170

Planta 56, 322—347 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Justus Liebig-Universität zu Gießen

BIOCHEMISCHE UND ENTWICKLUNGSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DES SCHOSSENS UND DER BLÜTENBILDUNG DER ZUCKERRÜBE*

II. Mitteilung

QUANTITATIVE VERÄNDERUNGEN DES EIWEISS-, AMINOSÄUREN- UND ZUCKERGEHALTES WÄHREND DES ÜBERGANGES IN DIE REPRODUKTIVE ENTWICKLUNG

Von

GEROLD SCHNEIDER

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. November 1960)

Einleitung

In einer ersten Mitteilung ist es nicht gelungen, die Blütenbildung der Zuckerrübe nach einer der heute geläufigen Hypothesen zu erklären (SCHNEIDER 1960). Dabei war allerdings auch lediglich der Versuch gemacht worden, die Blütenbildung experimentell zu beeinflussen und aus der Reaktion der Pflanze indirekte Schlüsse zu ziehen. Da stoffwechselphysiologische Untersuchungen aber im allgemeinen einen tieferen Einblick in den Mechanismus eines Vorganges gewähren, sollte versucht werden, auf diesem Wege dem Ziele näherzukommen.

Bekanntlich läßt sich die Zuckerrübe durch Vernalisation in „Blühstimmung" versetzen. Da sie durch Behandlung mit hohen Temperaturen selbst noch in der fortgeschrittenen reproduktiven Entwicklung gehemmt werden und wieder zum vegetativen Wachstum überführt werden kann (OWEN 1941), schien sie als Objekt für stoffwechselphysiologische Untersuchungen dieser Vorgänge besonders geeignet. Die erwähnten Tatsachen legen den Schluß nahe, daß thermolabile Komponenten (Proteine, Fermente) an der Umstimmung wesentlich beteiligt sein könnten. Dafür sprechen auch die Angaben verschiedener russischer Autoren (zusammenfassende Literatur bei BORRISS, 1952). So wird unter anderem durch die Vernalisation die Wirkung der Proteolasen verstärkt. METZNER (1955) fand ferner bei *Kalanchoë* Veränderungen im Proteinhydrolysat infolge photoperiodischer Induktion.

---

* Auszug aus einer Dissertation der Naturwissenschaftlich-Philosophischen Fakultät der Justus Liebig-Universität, Gießen.

Neben den Proteinen wurden auch die freien Aminosäuren als weitere Stickstoffkomponenten in die vorliegenden Untersuchungen mit einbezogen, zumal VIRTANEN u. LAINE (1936) Konzentrationsänderungen in der Pflanze während der Blütenbildung feststellten und LEOPOLD u. GUERNSEY (1953) berichteten, daß Aminosäuren die Blütenbildung zu beeinflussen vermögen. Außerdem ist bekannt, daß sich bei *Kalanchoë* im Laufe der photoperiodischen Induktion die Konzentration der freien Aminosäuren ändert (MADAN 1956).

Zur direkten Prüfung der Klebsschen Ansicht schien es neben der Analyse der Proteine und Aminosäuren ferner wichtig, die löslichen Kohlenhydrate zu untersuchen. DUPÉRON fand schon 1951, daß bei *Raphanus sativus* durch die Vernalisation der Gehalt an löslichen Kohlenhydraten beträchtlich erhöht wird.

Trotz zahlreicher weiterer Untersuchungen ist aber das Wesen der Vernalisation und der durch sie bedingten „Blühstimmung" noch nicht geklärt (zusammenfassende Literatur bei MELCHERS u. LANG 1948; BORRISS 1952 und HÄNSEL 1953).

Außer einer Arbeit von STOUT (1949) über die Veränderungen der Atmung und Katalaseaktivität während der Induktion sind mir keine weiteren biochemischen Untersuchungen über Vernalisation und Blütenbildung bei der Zuckerrübe bekannt.

Während im ersten Teil der vorliegenden Arbeit Methoden zur Analyse der löslichen Eiweiße, freien Aminosäuren und Kohlenhydrate mitgeteilt werden, befaßt sich der zweite Teil mit den quantitativen Veränderungen dieser Stoffklassen während des ungestörten Überganges von der vegetativen in die reproduktive Entwicklung der Zuckerrrübe.

Teil I

Biochemische Methoden

Zur Bestimmung der pflanzeneigenen Proteine, Aminosäuren und Zucker mußten mikrochemische Methoden herangezogen werden, die es gestatten, selbst geringe Materialmengen noch qualitativ und quantitativ hinreichend genau zu analysieren. In vielen Fällen erwies es sich hierzu erforderlich, die in der Literatur angegebenen Methoden zu modifizieren und auf das Objekt abzustimmen. Besonders wichtig ist für die papierchromatographische, bzw. papierelektrophoretische Zerlegung eines Pflanzenextraktes dessen Reinigung von störenden Begleitstoffen.

Extrakte von biologischem Material sind oft auch bei tiefen Temperaturen nur begrenzt haltbar. Durch die Wirkung noch aktiver Fermente kommt es z.B. besonders in Pflanzenpreßsäften leicht zu quantitativen Veränderungen. Dieser Tatsache wurde durch sofortige Verarbeitung des Materials ebenfalls Rechnung getragen.

A. Versuche zur Fraktionierung des Eiweißkomplexes der Zuckerrübe mit Hilfe der Hochspannungs-Papierelektrophorese

Die papierelektrophoretische Zerlegung pflanzlicher Eiweißkomplexe ist bekanntlich unter den üblichen Versuchsbedingungen (110 bis 220 Volt) kaum möglich (REGGELIN 1953, METZNER 1954), da die Proteine nicht vom Startpunkt fortwandern. Die genannten Autoren vermuten, daß für dieses Verhalten der Eiweiße Adsorptionskräfte verantwortlich zu machen sind. Nach den Angaben von BÜCHER u. Mitarb. (1952) könnte der Grund auch in der Denaturierung der Eiweißstoffe zu suchen sein. In einer früheren Mitteilung konnten wir zeigen (SCHNEIDER u. SPARMANN 1955b), daß die Wirkung der Adsorptionskräfte durch die Anwendung der Hochspannungs-Papierelektrophorese ausgeschaltet werden kann. Hierbei wird eine bedeutend höhere Feldstärke wirksam als bei der üblichen „Niedervoltelektrophorese".

Als günstigster Puffer für die Trennung pflanzeneigener (Gerste-, Zuckerrüben-) Eiweiße erwies sich der Borat-Natronlauge-Puffer nach SÖRENSEN von folgender Zusammensetzung: 12,404 g Borsäure + 100 cm³ nNaOH (carbonatfrei) ad 1000 cm³ Aqua dest. + 1500 cm³ n/10 NaOH (carbonatfrei). Dieser Puffer wurde im Verhältnis von 1:3 verdünnt. Dabei ändert sich sein p_H-Wert von 12,3 auf 11,5. Auf die pufferfeuchten Filtrierpapierstreifen wurde das zu analysierende Proteingemisch als Querstrich aufgetragen. Zur Untersuchung gelangten entweder Preßsäfte (0,09—0,15 cm³), die vor dem Auftragen kurz zentrifugiert und filtriert worden waren, oder nach der von SPARMANN u. SCHNEIDER (1955) für pflanzliches Material angegebenen Ultrafiltrationsmethode gewonnene Eiweißfilme, die mechanisch vom Filter leicht abgelöst werden konnten und in wenig Filtratlösung aufgenommen wurden[1]. Es erwies sich als ratsam, die Elektrophorese bei höchstens 1000 V Spannung in 1—3 Std durchzuführen; weder Serumproteine noch pflanzliche Eiweiße werden bei Anwendung höherer Spannung schärfer getrennt.

Die elektrophoretische Trennung der pflanzlichen Proteinkomponenten war schärfer, wenn die zu fraktionierenden Preßsäfte etwa 12 Std im Eisschrank (+ 3° C) gealtert waren, eine Feststellung, die SCHNEIDER u. Mitarb. (1954) auch für die Papierelektrophorese von menschlichem Spermaplasma treffen konnten. Bei gealterten pflanzlichen Preßsäften ist allerdings auch die an der Auftragstelle adsorbierte Eiweißmenge infolge Denaturierung beträchtlich, weshalb stets nur frischer Preßsaft papierelektrophoretisch fraktioniert wurde.

Die Anfärbung der Eiweißpherogramme erfolgte nach der von GRASSMANN u. HANNIG (1952) für Serumproteine angegebenen Arbeitsweise 10 min lang in einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz 10 B (Bayer) in einem Gemisch von 9 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig. Nach der Färbung wurden die Streifen zum Differenzieren in Entfärbebäder überführt, die sich aus 9 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig zusammensetzten. Die Entfärbung der nicht mit Eiweiß beladenen Stellen des Papieres erfolgte schneller, wenn die Bäder in ständiger Bewegung gehalten wurden. Nach 2—3 Std hat die Differenzierung ihr Optimum erreicht, d.h. der Papieruntergrund erscheint nur noch schwach blau angefärbt. Die lufttrockenen Streifen können längere Zeit im Dunkeln unbeschadet aufgehoben werden.

---

[1] Versuche zur Lösung der Eiweiße aus dem Filterrückstand mit geeigneten Puffergemischen führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen.

Mit Hilfe der Hochspannungs-Papierelektrophorese ließen sich aus Blattmaterial und Wurzeln der Zuckerrübe je 4 Proteinfraktionen isolieren (s. dazu auch SCHNEIDER u. SPARMANN 1955b, Abb. 1, S. 391), deren nähere Charakterisierung in Tabelle 1 erfolgt. Von den im Blattpreßsaft vegetativer einjähriger Kontrollpflanzen elektrophoretisch trennbaren Eiweißkomponenten liegt die am weitesten wandernde

Tabelle 1. *Das hochspannungs-papierelektrophoretische Verhalten der löslichen Zuckerrübeneiweiße unter den genannten Versuchsbedingungen*

Material	Puffer	Strom je Streifen in mA	Versuchsdauer in min	Auftragstelle	Wanderungsrichtung	Strecke in cm	Bezeichnung
Blatt	Borat-NaOH nach SÖRENSEN, Verdünnung 1:3 $p_H = 11{,}5$	3	180	10 cm von der Kathode	zur Anode	6,5	A_b
						4,5	B_b
						3,0	C_b
						1,1	D_b
Wurzel		2,5	100			5,0	A_w
						3,5	B_w
						2,3	C_w
						0,9	D_w

Fraktion (A) in höchster Konzentration (6,7%/Trg.)[1] vor. Die Konzentration der übrigen Komponenten ist geringer: B (2,8%/Trg.), C (0,8%/Trg.) und D (0,3%/Trg.). Ähnlich verhalten sich die im Wurzelpreßsaft nachweisbaren Eiweißkomponenten, mit dem Unterschied, daß ihre Konzentration geringer ist als die der entsprechenden Blattproteine: A (2,0%/Trg.), B (0,6%/Trg.) und C (0,5%/Trg.). Die Fraktion D konnte in den Blättern nur selten, in den Wurzeln überhaupt nicht quantitativ bestimmt werden, da sie nur in Spuren vorliegt. Außerdem ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld gering. Sie wird oft von den nichtwandernden Proteinkomponenten (z.B. dem Eiweißkomplex des Chlorophylls) überlagert.

Als Bezugssubstanz für die quantitative Auswertung der gefundenen Proteinfraktionen wurde elektrophoretisch reines Humanalbumin der Behring-Werke verwendet, dessen Eichkurve in den Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-6} g/cm³ einen linearen Anstieg aufweist.

B. Methoden zur Extraktion, Trennung und Identifizierung der in höherer Konzentration frei vorliegenden Aminosäuren

Gerade für die Analyse der frei vorliegenden Aminosäuren schien die unmittelbare Untersuchung des Preßsaftes am günstigsten. In ihm dürften die zum Zeitpunkt der Extraktion frei in der Pflanze vorliegenden Stoffe — soweit sie löslich sind — qualitativ und quantitativ enthalten sein, während bei Extraktionen stets mit Verlusten gerechnet werden muß.

[1] Angaben in Prozent des Trockengewichtes, bezogen auf Humanalbumin.

Zur Preßsaftgewinnung wurden 10—20 g frisches Pflanzenmaterial im Mörser zerkleinert, das Homogenisat ausgepreßt; der Preßsaft wurde kurz zentrifugiert und anschließend sofort auf Chromatographiestreifen aufgetragen. Alterung der Preßsäfte im Eisschrank (0° C) hat einen Anstieg des Gehaltes an freien Aminosäuren zur

Tabelle 2. *Anstieg des Aminosäurengehaltes eines Zuckerrübenblattpreßsaftes durch Altern im Eisschrank*

Werte in Prozent vom frischen Preßsaft.

Die Abkürzungen bedeuten: Aspsr = Asparaginsäure, Arg = Arginin, γ-Amb = γ-Aminobuttersäure, Ala = α-Alanin, Me = Methionin, Phen = Phenylalanin. Nähere Erläuterungen über die Fraktionierung dieser einzelnen Banden in Tabelle 4.

Alter	Freie Aminosäuren eines Blattpreßsaftes					
	Aspsr	Arg	γ-Amb	Ala	Me	Phen
24 Std	210%	209%	166%	150%	150%	100%
96 Std	180%	613%	785%	366%	500%	270%

Folge (Tabelle 2), der wahrscheinlich durch proteolytische Fermente bedingt wird, die selbst unter diesen Temperaturbedingungen ihre Aktivität nicht zu verlieren scheinen.

Zur Trennung der freien Aminosäuren wurde mit der aufsteigenden papierchromatographischen Methode gearbeitet. Als Lösungsmittel diente das Gemisch Isopropanol-Wasser-Ammoniak (70:27:3). Nach dem Entwickeln wurden die Streifen mindestens 2 Std lang an der Luft getrocknet. Das Besprühen erfolgte mit in n-Butanol gelöstem Ninhydrin (0,1%ige Lösung unter Zusatz von 1% Eisessig) nach: CONSDON u. GORDON (1948). Sofort nach dem Besprühen wurden die Chromatogramme 15 min lang bei 100° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre entwickelt.

Tabelle 3. *Der Einfluß eines Extraktes auf den R_f-Wert synthetischer Aminosäuren*

Synthetische Aminosäure	R_f-Wert der Substanz allein	R_f-Wert der Substanz im Preßsaft
Asparagin	0,26	0,22
Asparaginsäure	0,20	0,16
α-Aminobuttersäure	0,49	0,46
γ-Aminobuttersäure	0,31	0,29
Cystein	0,15	0,12
Cystin	0,14	0,12
Glutamin	0,28	0,22
Glutaminsäure	0,23	0,19
Glykokoll	0,30	0,28
Lysin-monohydrochlorid	0,21	0,19
Ornithin-dihydrochlorid	0,18	0,13
Phenylalanin	0,68	0,66
Serin	0,33	0,31
Taurin	0,42	0,38
Threonin	0,44	0,42
Tyrosin	0,44	0,40

Bei Anwendung dieser eindimensionalen Arbeitsweise ließen sich sowohl in Blatt- als auch in Wurzelpreßsäften je 7 ninhydrinpositive Banden nachweisen. Da die R_f-Werte synthetischer Substanzen oft durch den gleichzeitig aufgetragenen Extrakt beeinflußt werden (Tabelle 3), wurde zur Identifizierung der vorliegenden Aminosäurezonen die von KANDLER (1951) vorgeschlagene Methode gewählt. Das zu analysierende Stoffgemisch wird als Querstrich auf den Chromatographiestreifen aufgetragen, die synthetische Substanz als Punkt mit eingebracht.

Bei dem angewandten Lösungsmittel stimmen die R_f-Werte verschiedener Aminosäuren überein, so daß eine einwandfreie Identifizierung der Extraktstoffe nicht erfolgen konnte. Die eindimensionale papierchromatographische Analyse wurde deshalb durch die zweidimensionale Methode ergänzt. Wiederum wurden pro Testbogen zum Extrakt eine Reinsubstanz mit aufgetragen und das Testchromatogramm mit dem Kontrollbogen (Extrakt allein) verglichen. Als Lösungsmittel für die erste Laufrichtung diente das oben angegebene Isopropanol-Wasser-Ammoniak-Gemisch, für die zweite das n-Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch nach PARTRIDGE (1948).

Auch mit dieser Methode ist die Trennung gewisser Aminosäuren und Amide nicht möglich (z. B. Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin). Deshalb wurden weitere Identifizierungsversuche erforderlich. Dazu schien vor allem die Hochspannungs-Papierelektrophorese geeignet. Die jeweils günstigsten Trennungsbedingungen für die einzelnen Aminosäuren sind in Tabelle 4 angegeben.

Die pflanzeneigenen Aminosäuren und Amide wurden zunächst präparativ papierchromatographisch mit dem üblichen Lösungsmittel (Isopropanol-Wasser-Ammoniak) angereichert, die Einzelzonen ausgeschnitten und für sich mit Wasser bei 50° C eluiert, die Eluate stark eingeengt und unter den in Tabelle 4 angegebenen elektrophoretischen Daten fraktioniert und identifiziert. In Tabelle 4 sind nur die in höherer Konzentration in der Zuckerrübe frei vorliegenden Aminosäuren und Amide aufgeführt.

Obwohl die eindimensionale papierchromatographische Analyse der freien Aminosäuren nur Gruppentrennungen zuläßt, wurden dennoch diese Chromatogramme quantitativ ausgewertet, weil die Bestimmung der einzelnen Banden — im Gegensatz zu den Flecken der zweidimensionalen Chromatogramme — hier mit Hilfe des modifizierten Elphor-H-Gerätes photometrisch durchführbar ist. Eine quantitative Auswertung der durch Elution aus diesen Chromatogrammen gewonnenen Hochspannungs-Pherogramme ist nicht zweckmäßig, obwohl hier die einzelnen Aminosäuren getrennt vorliegen. Bei der Elution der Banden aus den eindimensionalen Chromatographiestreifen kommt es zu nicht definierbaren Substanzverlusten.

Als Bezugssubstanz zur quantitativen Auswertung der vorliegenden papierchromatographisch getrennten Banden wurde nach Möglichkeit die jeweils in höchster Konzentration vorliegende Komponente der Zone gewählt. Für quantitative Testzwecke konnten aber nur Substanzen verwendet werden, die sich unter den beschriebenen Bedingungen papierchromatographisch als einheitlich erwiesen. Obwohl neben der Aminosäurenkollektion der Firma Merck zahlreiche synthetische Aminosäuren der Deutschen Hoffmann-La Roche Gesellschaft[1] zur Verfügung

[1] Für das freundliche Entgegenkommen der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, die mir zahlreiche Aminosäuren zur Verfügung stellte, sei auch an dieser Stelle gedankt.

Tabelle 4. *Die papierchromatographische und hochspannungs-elektrophoretische Auftrennung der Aminosäuren aus Zuckerrübenblattpreßsaft, sowie deren Identifizierung*

Die Versuchsdauer für die elektrophoretische Fraktionierung der durch Papierchromatographie gewonnenen Banden 2 und 3 betrug 45 min, die aller übrigen Banden 60 min. Unter den genannten elektrophoretischen Versuchsbedingungen wandern alle aufgeführten Aminosäuren zur Kathode hin. Eine Ausnahme machen die Asparagin- und Glutaminsäure. Sie wandern anodenwärts. Weitere Erklärung der Tabelle erfolgt im Text. + = stark; ++ = sehr stark; — = schwach; — — = sehr schwach.

Bezeichnung und R_f-Wert der papierchromatographisch isolierten Banden (Lösungsmittel: Isopropanol-Wasser-Ammoniak = 70:27:3)		Weitere Auftrennung der papierchromatographisch gewonnenen Banden durch die Hochspannungs-Papierelektrophorese						
Bezeichnung der Banden	R_f-Wert	Puffer, bzw. Elektrolyt	Strom/Streifen (4 × 30 cm) in mA	Startpunkt	Identifizierte Stoffe	Wanderungsstrecke in cm	Geschätzte Mengenverhältnisse	Gewählte Bezugssubstanz
1	0,14	Essigsäure-Acetat n. WALPOLE $p_H = 5{,}6$ Verdünnung: 1:12,5	3,0	Streifenmitte	Asparaginsäure	7,5	+	Asparaginsäure (Merck)
					Glutaminsäure	6,0	++	
					Cystein und/oder	1,3	—	
					Cystin	1,3		
2	0,20		2,5	8 cm von der Anode	Arginin	15,3	— —	Arginin (Merck)
					?	10,3	—	
					?	9,7	— —	
					?	8,5	— —	
					Asparagin	7,8	++	
3	0,29	25 cm³ in Essigsäure mit Aqua dest. auf 500 cm³ aufgefüllt	2,5	13 cm von der Anode	γ-Aminobuttersäure	10,7	+	γ-Aminobuttersäure (Hoffmann-La Roche)
					Glykokoll	5,7	—	
					Serin	4,4	+	
					?	2,7	— —	
4	0,38		2,5	16,5 cm von der Anode	α-Alanin	5,3	++	α-Alanin (Merck)
					Threonin	3,3	+	
5	0,43		3,0	Streifenmitte	Tryptophan	3,8	— —	
6	0,55		2,5	11 cm von der Anode	?	8,0	—	Methionin (Merck)
					Valin	7,3	+	
7	0,65		3,0	15,5 cm von der Anode	Phenylalanin	3,8	—	Phenylalanin (Hoffmann-La Roche)
					Leucin und/oder	4,9	+	
					Isoleucin	4,9		

standen, erfüllten von den betreffenden Aminosäuren und Amiden nur die γ-Aminobuttersäure und das α-Alanin diese Forderung. Hingegen waren die Glutaminsäure, das Asparagin, das Valin und die Leucine nicht papierchromatographisch rein. In diesen Fällen diente diejenige Aminosäure einer Fraktion als Bezugssubstanz, deren synthetische Schwester sich papierchromatographisch nicht in mehrere Komponenten zerlegen ließ. Da die Valingruppe auch diese Bedingungen nicht erfüllte, wurde für sie Methionin, das eine Eichkurve mittlerer Steilheit hat, der quantitativen Auswertung zugrunde gelegt. Aus Tabelle 4 geht hervor, welche der Aminosäuren einer Fraktion jeweils als Testsubstanz für die quantitative Auswertung verwendet worden ist.

Das Auftragen von Testlösungen und Pflanzenextrakten auf die Filtrierpapierstreifen erfolgte mit Hilfe von Blutzuckerpipetten, die noch das Ablesen von 0,001 cm³ gestatten. Zur quantitativen Auswertung der freien Aminosäuren und Amide im Preßsaft wurden von diesem meist 0,02 cm³ pro Streifen (4 cm breit) aufgetragen.

Die eindimensional papierchromatographisch fraktionierten Aminosäurenbanden aus Blättern bzw. Wurzeln einjähriger, nicht vernalisierter Zuckerrüben haben im einzelnen folgenden Anteil am Trockensubstanzgehalt dieser Organe (ermittelt aus Preßsäften):

1. Blätter (mittleren Alters): Asparaginsäure 0,18%; Arginin 0,22%; γ-Aminobuttersäure 0,3%; Alanin 0,09%; Methionin 0,04% und Phenylalanin 0,02%.

2. Wurzel (ohne Rübenkopf): Asparaginsäure 0,16%; Arginin 0,22%; γ-Aminobuttersäure 0,09% und Alanin 0,04%. Die Fraktionen Methionin und Phenylalanin liegen in der Wurzel nur in Spuren vor.

C. Die qualitative papierchromatographische Analyse der freien Zucker in Zuckerrübenpreßsäften

Neben den freien Aminosäuren und Amiden liegen in Blatt- bzw. Wurzelpreßsäften der Zuckerrübe auch die freien Zucker vor, die ebenfalls papierchromatographisch nachgewiesen werden können.

Die Glucose wird nach dem Entwickeln der Chromatographiestreifen in dem Lösungsmittelgemisch Isopropanol-Wasser-Ammoniak (70:27:3) mit dem Anilinphthalat-Reagens nach PARTRIDGE (1949) (1,66 g Phthalsäure und 0,93 g Anilin in 100 cm³ wassergesättigtem n-Butanol) erfaßt. Mit diesem Reaktionsgemisch werden die Streifen besprüht und im Trockenschrank 10 min lang auf 100° C erwärmt. Die quantitative Auswertung der braun gefärbten Banden ist zwischen 5 und 1000 γ (s. Abb. 1) möglich. Das Reaktionsprodukt zeichnet sich durch eine empfindliche gelbe Fluorescenz aus.

Es ist bemerkenswert, daß mit dem Perchlorsäurereagens nach GORDON u. WEBER (1951), das von BENNET-CLARK u. Mitarb. (1952) für den papierchromatographischen Nachweis der Indolderivate modifiziert wurde, verschiedene Zucker ebenfalls eine Reaktion ergeben. Die Reaktion erfolgt im Wärmeschrank bei 50° C

in 5 Std. Es reagieren: Fructose (grau-schwarz), Saccharose (grau-schwarz), Xylose (grau-schwarz) Ribose (grau-schwarz), Arabinose (schwach grau) und Lactose (schwach gelb). Keine Reaktion dagegen ergeben Glucose, Galaktose und Maltose.

Die Färbung von Fructose und Saccharose mit dem Perchlorsäurereagens schlägt von gelb nach braun und schließlich grau-schwarz um. Die quantitative papierchromatographische Auswertung des letzten (grau-schwarzen) Reaktionsproduktes zwischen der Saccharose und dem Perchlorsäurereagens ist möglich (Abb. 2)[1].

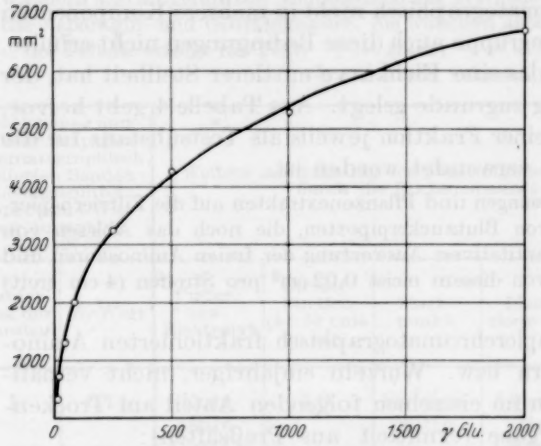


Abb. 1. Eichkurve zur quantitativen Bestimmung der Glucose. Ordinate: Planimetrierte Fläche unter der photometrisch ermittelten Verteilungskurve

Die Identifizierung der in der Pflanze vorliegenden Zucker wurde sowohl einals auch zweidimensional papierchromatographisch durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden die in Abschnitt „B", S. 326, 327 genannten Gemische verwendet, die dort für die Trennung der Aminosäuren herangezogen wurden. Die Papierelektrophorese ergab bei Spannungen bis zu 3000 V ebenfalls günstige Trenneffekte.

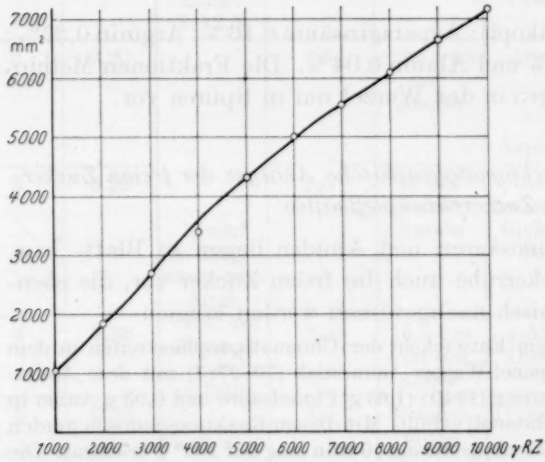


Abb. 2. Eichkurve zur quantitativen Bestimmung der Saccharose (Perchlorsäurereaktion). Ordinate: Planimetrierte Fläche unter der photometrisch ermittelten Verteilungskurve

In 0,04 cm³ Zuckerrübenblattpreßsaft ist neben der Glucose auch die Fructose papierchromatographisch nachweisbar und liegt in quantitativ auswertbarer Konzentration vor. Die Wurzeln der vegetativen Pflanzen zeichnen sich außer durch ihren Saccharosegehalt durch das Auftreten von Traubenzucker aus. In den Wurzeln schossender Zuckerrüben konnte außerdem Fructose nachgewiesen werden.

[1] Über die Spezifität der zum Nachweis pflanzlicher Wuchsstoffe mit Indolcharakter häufig verwendeten Reagentien soll an anderer Stelle ausführlicher berichtet werden.

D. Die quantitative photometrische Auswertung der Papierchromatogramme, bzw. Elektropherogramme

Die Chromatogramme bzw. Elektropherogramme wurden mit dem von GRASSMANN u. HANNIG angegebenen Elphor-H-Gerät photometrisch ausgemessen. Da die Unterschiedsempfindlichkeit des in das Gerät eingebauten Meßinstrumentes zur Auswertung schwach angefärbter Aminosäuren- und Zuckerzonen zu gering ist, wurde eine Modifizierung des Photometers erforderlich.

Die Chromatogramme werden millimeterweise über einen Lichtspalt von 1 mm Breite hinwegbewegt und die durch angefärbte Zonen hervorgerufene Lichtschwächung mit dem Spiegelgalvanometer HLM4 (Hartmann & Braun, Frankfurt a. Main), Empfindlichkeitsstufe „0" (0,01 μA/Skalenteil) gemessen. In den Stromkreis des Photoelementes ist ein Drehpotentiometer eingeschaltet (0—500 kΩ), das die Einstellung des Anzeigeinstrumentes auf den Papierleerwert (100 Skalenteile) ermöglicht.

Nach den Angaben von KORTÜM (1948, S. 78) ist der Photostrom eines Photoelementes nur dann der Lichtstärke direkt proportional, wenn an den Stromkreis nur ein geringer Widerstand angelegt wird. Da das Spiegelgalvanometer in seiner Empfindlichkeitsstufe „0" einen Innenwiderstand von 25300 Ω hat, mußte die Abhängigkeit des Stromes von der Lichtintensität bei der beschriebenen Meßanordnung geprüft werden. Die auf das Photoelement einwirkende Lichtintensität wurde durch einen zwischen Lichtspalt und Photoelement kontinuierlich vorbeigeführten Graukeil mit der Keilkonstanten 0,1/cm und 10 cm Länge reduziert[1]. Abb. 3 gibt die gefundene Proportionalitätskurve wieder, die eine photometrische Auswertung von Chromatogrammen mit dieser Meßanordnung durchaus rechtfertigt.

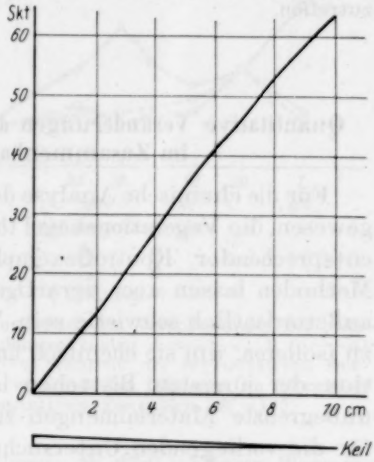


Abb. 3. Proportionalität zwischen Lichtintensität und Photostrom des Photoelementes der im Text näher erläuterten Meßanordnung für die quantitative Auswertung von Chromatogrammen und Pherogrammen. Abszisse: Einstellung des Graukeiles über dem Lichtspalt des Photometers. Ordinate: Photostrom des Photoelementes, angegeben in Skalenteilen des Spiegelgalvanometers

Das sonst übliche Tränken der Filtrierpapierstreifen mit Transparenzöl erwies sich als unzweckmäßig, weil infolge der in diesem Falle herrschenden größeren Durchlässigkeit des Papieres dem Meßinstrument ein höherer Widerstand vorgeschaltet werden muß, um die Einstellung des Papierleerwertes zu ermöglichen.

Für die Aminosäuren- und Zuckerchromatogramme genügt als Photometerlichtquelle eine Glühlampe von 5 Watt. Für die Auswertung der Eiweißpherogramme ist eine 10 Watt starke Lichtquelle erforderlich.

[1] Die Firma Zeiss Ikon AG, Berlin-Friedenau, hatte die Freundlichkeit, mir den zu diesen Messungen erforderlichen Graukeil zur Verfügung zu stellen, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Die Flächenintegration der Durchlässigkeitskurven wurde durch Wägung der ausgeschnittenen Verteilungskurven vorgenommen.

In denjenigen Fällen, in denen die Papierleerwerte unterhalb und oberhalb (bezüglich der Steigrichtung des Lösungsmittels gesehen) einer gemessenen Bande nicht übereinstimmten, wurden die gefundenen Werte für das reine Papier durch eine Gerade verbunden, die zur Verteilungskurve gehörende Nullinie also „schräg" gelegt.

Der Fehler bei der photometrischen Auswertung von Chromatogrammen mit dem modifizierten ElphorH-Gerät beträgt — einschließlich der Ermittlung der Flächen der Verteilungskurven — 1—2%. Der mittlere methodische Fehler bei der quantitativen papierchromatographischen Bestimmung der Substanzen im Preßsaft liegt bei 7—8%. Diese Abweichung wurde für Glucose im Blattpreßsaft ermittelt und dürfte auch weitgehend für die Eiweiß- und Aminosäurenbestimmungen zutreffen.

Teil II

Quantitative Veränderungen der Eiweiße, Aminosäuren und Zucker im Zusammenhang mit der Blütenbildung

Für die chemische Analyse der Blütenbildung wäre es wünschenswert gewesen, die Vegetationskegel thermisch induzierter Pflanzen und solche entsprechender Kontrollexemplare zu vergleichen. Die chemischen Methoden lassen aber derartige Untersuchungen nicht zu. Es dürfte außerordentlich schwierig sein, Vegetationspunkte in genügender Menge zu isolieren, um sie chemisch analysieren zu können. Auch die Extraktion der jüngsten Blättchen ist nur dann möglich, wenn praktisch unbegrenzte Materialmengen zur Verfügung stehen. Deshalb wurden für die vorliegenden Untersuchungen Blätter mittleren Alters gewählt, und zwar bei Pflanzen im Rosettenstadium Blätter aus der Mitte der Rosette, bei schossenden Pflanzen Blätter vom mittleren Achsenabschnitt. Diese Blätter mittleren Alters befinden sich noch in starkem Wachstum. Nach MOTHES u. ENGELBRECHT (1952) sind biochemisch-blühphysiologische Untersuchungen an den genannten Organen durchaus sinnvoll: „Der Blühvorgang ist mit tiefgreifenden chemischen Veränderungen verbunden, die sich nicht auf die reproduktiven Organe beschränken, sondern auch in den vegetativen nachweisbar sind."

Um Fehler in der quantitativen Bestimmung der interessierenden Stoffe nach Möglichkeit auszuschalten, wurden stets Versuchs- und Kontrollpflanzen gleichzeitig extrahiert. Die Analysenergebnisse sind stets auf das Trockengewicht bezogen. Der besseren Übersicht wegen wurden sie nicht in Absolutwerten angegeben, sondern die für die vernalisierten Pflanzen gefundenen Daten auf die Kontrollwerte bezogen, die gleich 100 gesetzt wurden (%v/K).

A. Vergleichende biochemische Untersuchungen gleichaltriger vernalisierter und Kontrollpflanzen in dem Zeitraum zwischen Vernalisation und Blütenbildung

Während der Vernalisation wurden Versuchs- und Kontrollpflanzen zwar bei verschiedenen Temperaturen, aber unter sonst möglichst gleichen Bedingungen kultiviert. So durften beispielsweise während der Kältebehandlung der Versuchspflanzen auch die Kontrollen nur schwach wachsen. Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurde die natürliche Winterruhe der Pflanzen ausgenutzt. Die Versuchspflanzen wurden im Oktober in Frühbeete gebracht und hier unter den gleichen (natürlichen) Lichtbedingungen kultiviert wie die Kontrollen im Gewächshaus. Daher ist ein Vergleich der Pflanzen durchaus zulässig.

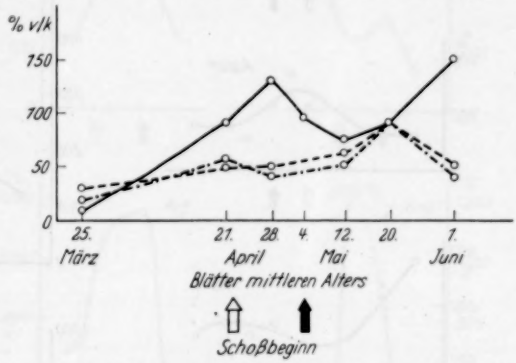


Abb. 4. Die quantitativen Veränderungen der löslichen Blattproteinfraktionen A (o——o), B (o- - -o) und C (o-·-·-o) während der reproduktiven Entwicklung der vernalisierten Pflanzen im Vergleich zu vegetativen Kontrollen ($K = 100$)

Vernalisierte und Kontrollpflanzen unterscheiden sich zunächst morphologisch nicht voneinander. Der Schoßbeginn der „blühgestimmten" Pflanzen läßt sich frühzeitig am Längsschnitt durch den Vegetationskegel erkennen (s. I. Mitteilung, S. 672). Dieser Termin („mikroskopischer Schoßbeginn") ist in den folgenden Kurven durch einen weißen Pfeil markiert. Der schwarze Pfeil gibt dagegen den „makroskopisch sichtbaren Schoßbeginn" an. Zu diesem Zeitpunkt ist die Achse erst etwa 1 cm lang. Ihre Streckung erfolgt alsdann sehr rasch. Vom makroskopischen Schoßbeginn an gerechnet beträgt ihre Länge nach 8 Tagen 15, nach 16 Tagen 20, nach 27 Tagen bereits 75 cm. Die Pflanzen stehen nunmehr kurz vor der Blüte.

Die Vernalisation hat eine Abnahme der löslichen, hochspannungspapierelektrophoretisch fraktionierbaren Eiweißkomponenten in den Blättern mittleren Alters zur Folge (Abb. 4). Die einzelnen Proteinfraktionen stehen nach Abschluß der Kältebehandlung zunächst in einem nahezu gleichen Verhältnis zu den Eiweißen der Kontrollen. Die Konzentration der Eiweißkomponenten B und C steigt in der Zeit zwischen dem Abschluß der Kältebehandlung bis kurz vor dem Öffnen der ersten Blüten (20. 5.) kontinuierlich bis nahe an den Kontrollwert an, sinkt alsdann aber wieder stark ab. Während die Konzentrationsänderungen der Fraktionen B und C nahezu konform verlaufen, verhält

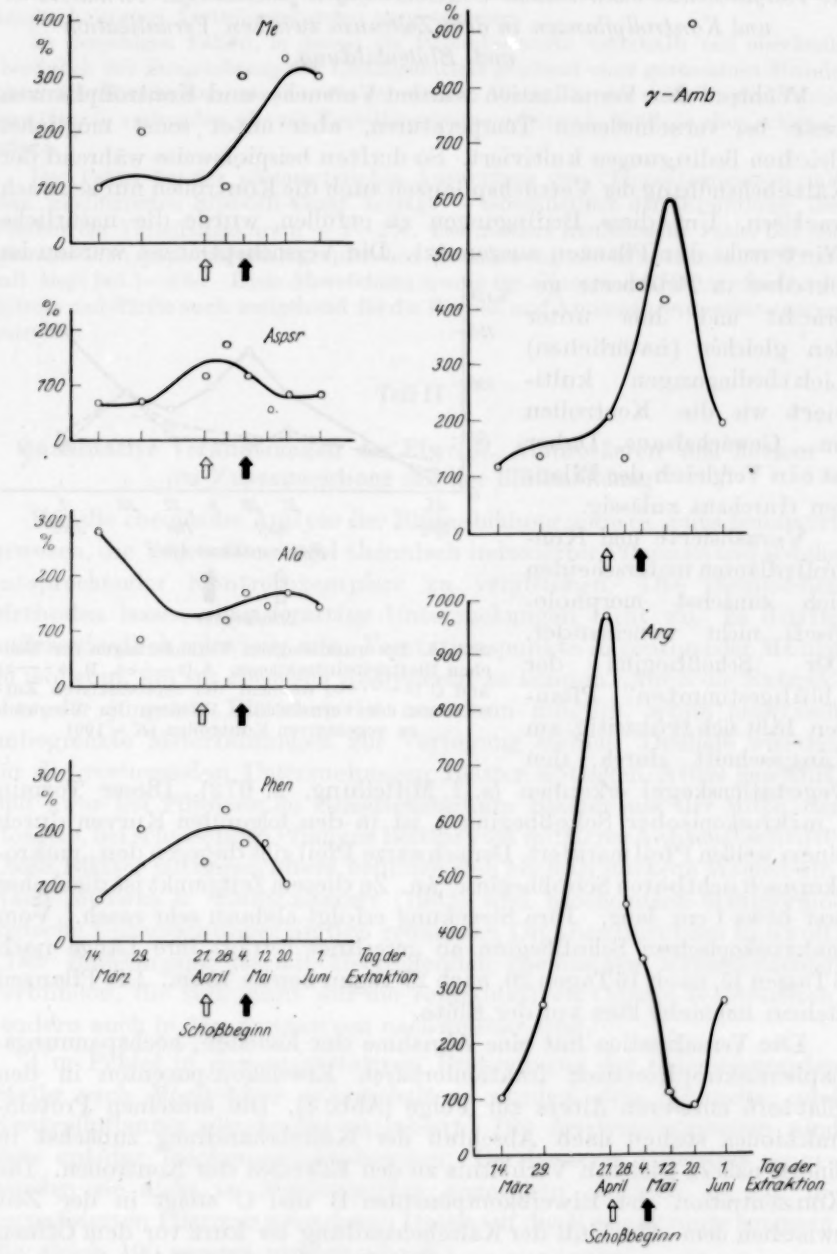


Abb. 5. Das Verhältnis der Blattaminosäuren vernalisierter Pflanzen im Laufe der reproduktiven Entwicklung zu den Werten entsprechender Kontrollexemplare ($K = 100$). Die Abkürzungen bedeuten: *Me* Methionin; *Aspsr* Asparaginsäure; *Ala* α-Alanin; *Phen* Phenylalanin; *γ-Amb* γ-Aminobuttersäure; *Arg* Arginin

sich die Fraktion A abweichend. Ihre Konzentration steigt zunächst stark an und erreicht kurz vor dem makroskopischen Schoßbeginn ein Maximum, das über dem Kontrollwert liegt. Mit dem einsetzenden Schossen der Pflanzen nimmt die Menge der Eiweißfraktion A zunächst stark ab, steigt aber mit der fortschreitenden Streckung der Achse schließlich erneut über den Kontrollwert an.

Das Verhältnis der freien Aminosäurenfraktionen der kältebehandelten Pflanzen zu den Kontrollen während des Überganges in die sexuelle Reproduktion und der weiteren reproduktiven Entwicklung geht aus Abb. 5 hervor. Die Vernalisation selbst scheint auf den Aminosäurengehalt der Pflanzen wenig Einfluß zu haben, da nach Abschluß der Kältebehandlung die Konzentration der freien Aminosäuren in Blattpreßsäften induzierter Pflanzen und entsprechender Kontrollexemplare praktisch übereinstimmt. Eine Ausnahme macht die Alaninfraktion, deren Menge bei den Versuchspflanzen den Kontrollwert nahezu um das 3fache übersteigt. Vor allem die γ-Aminobuttersäurefraktion, aber auch die Phenylalanin- und Asparaginsäuregruppe erreichen z. Z. des makroskopischen Schoßbeginnes (schwarzer Pfeil) ein Konzentrationsmaximum. Die Konzentrationen von Methionin und Alanin steigen in den Blättern während des Schoßbeginnes an. Die Argininfraktion hat zu diesem Zeitpunkt ihren Maximalwert bereits überschritten. Es ist bemerkenswert, daß der eigentliche Schoßbeginn der Pflanzen, mit dem auch die Differenzierung der Blütenknospen verbunden ist, zeitlich etwa 15 Tage früher liegt (weißer Pfeil) als

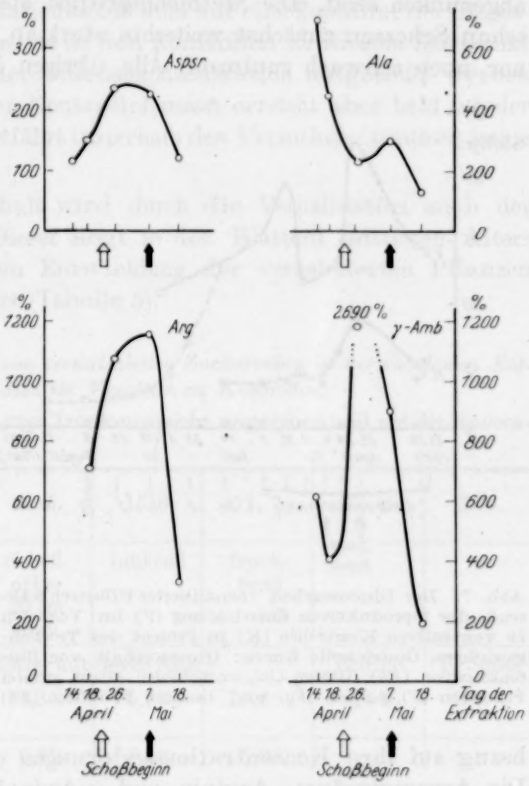


Abb. 6. Die Aminosäurenfraktionen von Wurzeln vernalisierter Pflanzen im Laufe der Entwicklung im Vergleich zu vegetativen Kontrollen ($K = 100$). Erklärung der Abkürzungen in der Legende zu Abb. 5

der makroskopische (s. I. Mitteilung, S. 672 u. 673). Demnach fällt mit dem mikroskopischen Schoßbeginn der induzierten Pflanzen ein deutliches Konzentrationsmaximum der Asparaginsäure-, Phenylalanin- und Argininfraktion zusammen, während die Methionin-, Alanin- und γ-Aminobuttersäuregruppe zu diesem Zeitpunkt auf einen Minimalwert abgesunken sind. Die Methioningruppe steigt mit dem makroskopischen Schossen zunächst weiterhin stark an, während der Alaningehalt nur noch schwach zunimmt. Alle übrigen Fraktionen fallen zu dieser Zeit ab, besonders stark die γ-Aminobuttersäurebande.

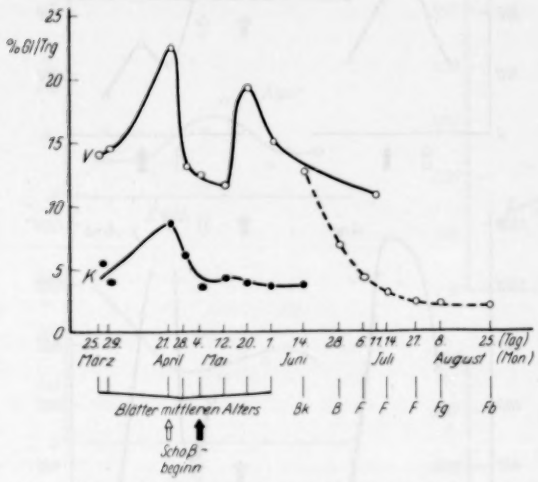


Abb. 7. Der Glucosegehalt vernalisierter Pflanzen während der reproduktiven Entwicklung (*V*) im Vergleich zu vegetativen Kontrollen (*K*) in Prozent des Trockengewichtes. Gestrichelte Kurve: Glucosegehalt von Blütenknospen (*Bk*), Blüten (*B*), verschieden alten, grünen Früchten (*F*), gelben (*Fg*) und braunen Früchten (*Fb*)

Die Untersuchungen über die quantitativen Veränderungen der Wurzelaminosäuren beim Übergang der Pflanzen in die reproduktive Phase konnten aus technischen Gründen leider erst kurz vor dem mikroskopischen Schoßbeginn einsetzen. Die in den Wurzelpreßsäften bestimmbaren freien Aminosäuren des vernalisierten Materials verhalten sich — außer der Alaninfraktion — in dem interessierenden Zeitraum in bezug auf ihre Konzentrationsänderungen übereinstimmend (Abb. 6). Die Asparaginsäure-, Arginin- und γ-Aminobuttersäurefraktion steigen bis zum Schoßbeginn stark an, erreichen zu diesem Termin einen Maximalwert (besonders auffällig die γ-Aminobuttersäuregruppe mit dem fast 27fachen Wert der Kontrolle), um während des Schossens der Pflanzen schließlich wieder auf ihren Ausgangswert (Asparaginsäure) oder darunter (Arginin-, γ-Aminobuttersäurefraktion) abzusinken. Nur der Alaningehalt nimmt bis zum mikroskopischen Schoßbeginn ab, steigt alsdann erneut schwach an und fällt mit der makroskopisch sichtbaren Streckung der Achse wieder ab.

Der Glucosewert der vernalisierten Pflanzen ist nach Abschluß der Kälteeinwirkung höher als bei den Kontrollen (Abb. 7). Das Verhältnis zwischen kältebehandelten und Kontrollpflanzen bleibt bis zum makroskopischen Schoßbeginn der induzierten Exemplare nahezu konstant.

Während des Schossens steigt der Glucosespiegel in den Blättern der reproduktiven Pflanzen erheblich an. In den Blütenknospen, Blüten und verschieden reifen Früchten läßt sich hingegen ein Absinken der Glucosekonzentration feststellen.

Der Anstieg des Glucosewertes in den Blättern mittleren Alters direkt nach Abschluß der Vernalisation muß wohl auf eine Zunahme der Tageslänge zurückgeführt werden, da in den Kontrollen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine Erhöhung der Glucosekonzentration festgestellt werden kann. Der Glucosewert der Kontrollpflanzen erreicht aber bald wieder seinen Ausgangswert und erfährt innerhalb des Versuchszeitraumes keine weiteren Veränderungen.

Neben dem Glucosegehalt wird durch die Vernalisation auch der Fructosespiegel erhöht. Dieser liegt in den Blättern mittleren Alters während der reproduktiven Entwicklung der vernalisierten Pflanzen stets über dem Kontrollwert (Tabelle 5).

Tabelle 5. *Der Fructosegehalt von vernalisierten Zuckerrüben in verschiedenen Entwicklungsstadien im Vergleich zu Kontrollen.*

Die Werte sind in Prozent vom Trockengewicht angegeben und auf die Saccharoseeichkurve bezogen.

Datum der Extraktion	25. 3.	20. 5.	15. 6.	11. 7.	27. 6.	3. 8.
Entwicklungszustand der extrahierten Pflanzen	Rosettenstadium	Schoßachse 20 cm hoch	blühend	fruchtend		
Art des Materials	Blätter mittleren Alters				Blüten	Früchte
Vernalisierte Pflanzen	12,5%	14,3%	6,7%	10,2%	0,4%	0,9%
Kontrollen	3,0%	0,6%	5,5%	5,0%		

Es ist auffallend, daß mit dem Schossen der Pflanzen in den Wurzeln neben der für die Kontrollen charakteristischen Saccharose jetzt auch die Fructose nachweisbar ist und daß die Glucose in erhöhter Konzentration vorliegt. Der Saccharosegehalt ist hingegen zu diesem Zeitpunkt reduziert. Dieser Befund läßt auf eine erhöhte Invertaseaktivität in den Wurzeln schossender Pflanzen schließen. Da nach der Vernalisation der Saccharosegehalt von kältebehandelten und Kontrollwurzeln zunächst praktisch übereinstimmt, hat die Kältebehandlung offensichtlich auf die Invertaseaktivität keinen direkten Einfluß.

In Abb. 8 sind die Trockengewichte der Blätter von Kontrollpflanzen und vernalisierten Exemplaren, sowie die von Blütenknospen, Blüten und Früchten aufgezeichnet. Der Trockensubstanzgehalt der Blätter

vernalisierter Pflanzen ist nach Abschluß der Kältebehandlung höher als der der Kontrollen, sinkt aber bald unter den Kontrollwert ab und erreicht zum makroskopischen Schoßbeginn ein Minimum. Mit dem einsetzenden Schossen der reproduktiven Exemplare erfolgt ein Anstieg des Trockensubstanzgehaltes in den Blättern. Blätter bereits fruchtender Pflanzen zeichnen sich wieder durch ein geringeres Trockengewicht aus. Der Trockensubstanzgehalt junger Früchte ist niedriger als der der Blütenknospen und Blüten; mit zunehmender Reife steigt er jedoch in den Früchten stark an.

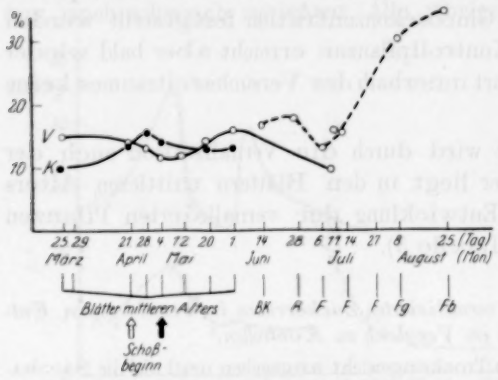


Abb. 8. Der Trockensubstanzgehalt vernalisierter Pflanzen während der reproduktiven Entwicklung (*V*) im Vergleich zu vegetativen Kontrollen (*K*). Gestrichelte Kurve: Trockensubstanzgehalt von Blütenknospen (*Bk*), Blüten (*B*), verschieden alten, grünen Früchten (*F*), gelben (*Fg*) und braunen Früchten (*Fb*). Alle Werte in Prozent des Frischgewichtes

Faßt man die wichtigsten stoffwechselphysiologischen Veränderungen, die durch die Vernalisation bedingt werden und die während der einsetzenden reproduktiven Entwicklung der Pflanzen festzustellen sind, zusammen, so ergibt sich:

Die Kältebehandlung führt zu einer Abnahme der Konzentration der hochspannungs-papierelektrophoretisch fraktionierbaren Eiweißkomponenten in den Blättern. Während der weiteren Entwicklung der vernalisierten Pflanzen nimmt die Konzentration der Fraktionen B und C in den Blättern kontinuierlich zu, erreicht kurz vor dem Aufblühen ein nur wenig unter dem Kontrollwert gelegenes Maximum, fällt aber dann wieder stark ab. Die Fraktion A steigt dagegen zum Schoßbeginn über den Kontrollwert an, fällt mit dem Beginn des Schossens stark ab, um kurz vor dem Aufblühen der Pflanzen erneut anzusteigen.

Die Vernalisation hat auf den Aminosäuregehalt der Blätter offenbar nur wenig Einfluß. Außer der Methionin- und Alaningruppe in den Blättern und der Alaningruppe in den Wurzeln nimmt die Konzentration aller übrigen untersuchten Aminosäurenfraktionen bis zum Schoßbeginn der Pflanzen stark zu, erreicht zu diesem Zeitpunkt einen Maximalwert und sinkt mit dem einsetzenden Schossen wieder stark ab.

Durch die Vernalisation wird der Glucose- und Fructosegehalt der Blätter erhöht. Die Konzentration beider Substanzen ist in den Blättern kältebehandelter Pflanzen im Laufe der weiteren Entwicklung stets höher als in den Kontrollen. Zum Schoßbeginn ist der Glucosegehalt auf einen Minimalwert abgesunken, steigt aber sofort wieder stark an.

Ein erhöhter Glucose- und Fructosegehalt neben einer verminderten Saccharosekonzentration in den Wurzeln schossender Pflanzen deuten auf eine verstärkte Invertaseaktivität hin.

Der Trockensubstanzgehalt der Blätter kältebehandelter Pflanzen sinkt bis zum Schoßbeginn ab, steigt mit dem einsetzenden Schossen aber wieder auf seinen Ausgangswert an. Die Blätter fruchtender Pflanzen sind arm an Trockensubstanz.

B. Die Verteilung der Eiweiße, freien Aminosäuren und Zucker in den einzelnen Organen der reproduktiven Pflanzen

Die Konzentration der einzelnen Proteinfraktionen in den Blüten und Früchten geht aus Abb. 9 hervor. Während die Blütenknospen sehr reich an der Komponente A sind, liegen die Fraktionen B und C nur in geringer Menge vor. Der Spiegel der Fraktion A sinkt in den Blüten und Früchten stark ab. Dagegen erreicht die Komponente B in den Blüten einen Maximalwert und sinkt in den Früchten kontinuierlich mit zunehmender Reife ab, während die Fraktion C in grünen Früchten einen maximalen Wert erreicht und in den gelb-braunen, nahezu reifen Früchten auch auf den Wert der B-Eiweißkomponente abgesunken ist.

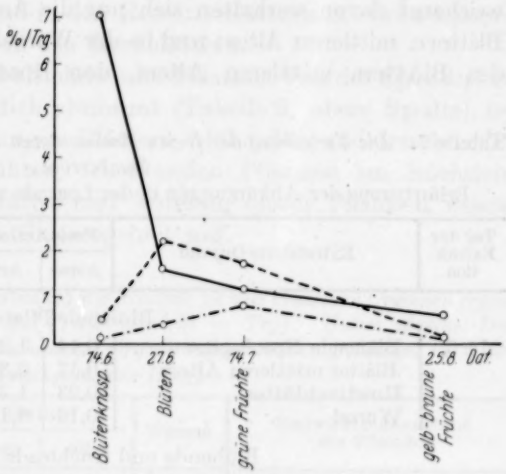


Abb. 9. Die Verteilung der Proteinfraktionen A (o—o), B (o- - -o) und C (o-·-·-o) in den Blüten und Früchten. Werte in Prozent des Trockengewichtes

Die Verteilung der einzelnen Aminosäuren in den Blüten und Früchten geht aus Tabelle 6 hervor. Der Aminosäuregehalt von Blütenknospen und Blüten liegt durchschnittlich höher als derjenige der Früchte. Mit zunehmender Reife der Samenknäuel ist ein weiterer Rückgang der Konzentration der einzelnen freien Aminosäurenfraktionen verbunden. Davon weicht nur die Asparaginsäuregruppe deutlich ab. Ihre Konzentration ist in den Blütenknospen und Blüten gering, hoch dagegen in grünen Früchten. Mit zunehmender Fruchtreife sinkt der Asparaginsäurespiegel aber auch erheblich ab.

Auch aus Tabelle 7, die die Verteilung der Aminosäuren in blühenden, fruchtenden und abgeblühten Pflanzen wiedergibt, geht hervor, daß

Tabelle 6. *Die Verteilung der freien Aminosäuren und Amide in Blütenknospen, Blüten und Früchten der Zuckerrübe*

Erläuterung der Abkürzungen in der Legende zu Tabelle 2.

Datum	Freie Aminosäuren in % vom Trockengewicht						Extrahiertes Material
	Aspsr	Arg	γ-Amb	Ala	Me	Phen	
28. 6.	0,07	0,74	0,20	0,06	0,05	0,07	Blütenknospen und Blüten
6. 7.	0,18	0,70	0,14	0,02	Spuren		grüne Früchte
14. 7.	0,17	0,70	0,17	0,06	0,03	0,01	grüne Früchte
8. 8.	0,05	0,21	0,07	0,02	0,01	0,01	grün-gelbe Früchte
25. 8.	0,03	0,10	0,13	0,03	0,03	0,01	gelb-braune Früchte

mit dem Altern der reproduktiven Zuckerrübe die Konzentration der Aminosäuren in den einzelnen Organen im allgemeinen absinkt. Abweichend davon verhalten sich nur die Asparaginsäurefraktion in den Blättern mittleren Alters und in der Wurzel, sowie der Argiringehalt in den Blättern mittleren Alters, den Rosettenblättern und Wurzeln,

Tabelle 7. *Die Verteilung der freien Aminosäuren in der blühenden und fruchtenden Zuckerrübe*

Erläuterung der Abkürzungen in der Legende zu Tabelle 2.

Tag der Extraktion	Extrahierte Organe	Freie Aminosäuren in % vom Trockengewicht					
		Aspsr	Arg	γ-Amb	Ala	Me	Phen
	Blühende Pflanze						
15. 6.	Blühende Sproßspitzen . .	0,14	1,27	0,10	0,23	0,20	0,09
	Blätter mittleren Alters .	0,17	0,30	1,10	0,19	0,10	0,06
	Rosettenblätter	0,23	1,30	1,16	0,09	0,10	0,06
	Wurzel	0,16	0,13	0,10	Spur	0,03	Spur
	Blühende und fruchtende Pflanze						
11. 7.	Noch blühende Sproßspitzen	0,14	0,56	0,21	0,02	0,01	0,01
	Blätter mittleren Alters .	0,24	0,37	0,30	0,03	0,03	Spur
	Rosettenblätter (vergilbend)	0,18	0,26	0,22	0,05	0,08	0,05
	Wurzel	0,23	0,15	0,15	0,02	0,06	Spur
	Abgeblühte, fruchtende Pflanze						
12. 8.	Fruchtende Sproßspitzen	0,10	0,40	0,13	0,03	0,03	0,02
	Blätter mittleren Alters .	0,11	0,78	0,14	0,02	0,06	0,03
	Basalteile von Sproßachsen (Blätter und Achse) . .	0,11	0,40	0,17	0,03	0,03	0,02
	Wurzel	0,20	0,17	0,06	0,02	Spur	Spur

teilweise auch die γ-Aminobuttersäuregruppe (in Sproßspitzen und Wurzeln). Zum Vergleich sind in Tabelle 8 die Aminosäurenwerte angegeben, die in den aufgeführten Organen vegetativer Pflanzen gefunden wurden. Es ist bemerkenswert, daß die hier vorliegenden Verhältnisse der Verteilung der Aminosäuren nahezu denen der geschoßten, blühenden Pflanzen entsprechen, obwohl die Absolutwerte differieren.

Tabelle 8. *Die Verteilung der freien Aminosäuren in der vegetativen, einjährigen Zuckerrübe*

Erläuterung der Abkürzungen in der Legende zu Tabelle 2.

Extrahierte Organe	Freie Aminosäuren in % vom Trockengewicht					
	Aspsr	Arg	γ-Amb	Ala	Me	Phen
Herzblätter	0,24	0,94	0,58	0,14	0,10	0,04
Blätter mittleren Alters .	0,26	0,71	0,41	0,14	0,07	0,04
Rosettenblätter	0,26	0,53	0,19	0,10	0,08	0,05
Wurzel	0,15	0,30	0,10	0,05	0,02	0,01

Der Konzentrationsabfall von den jungen zu den älteren Organen und zur Wurzel wird bei den vegetativen Exemplaren besonders deutlich. Eine Ausnahme macht nur die Asparaginsäurefraktion, die in den Blättern mittleren Alters und in den Rosettenblättern in etwas höherer Konzentration vorliegt als in den Herzblättern.

Während der Glucosegehalt blühender Pflanzen von der Sproßspitze zur Wurzel hin kontinuierlich abnimmt (Tabelle 9, obere Spalte), ist der Glucosewert in den jungen Blättern blühender und fruchtender Pflanzen sowie in abgeblühten, fruchtenden Pflanzen am höchsten. Die Sproßspitzen, alten Blätter und Wurzeln dieser Pflanzen weisen einen bedeutend geringeren Glucosegehalt auf.

Tabelle 9. *Obere Spalte: Die Verteilung der Glucose in den einzelnen Organen reproduktiver Pflanzen (bezogen auf das Trockengewicht = Trg). Untere Spalte: Der Trockensubstanzgehalt (Trg) verschiedener Organe reproduktiver Pflanzen in % des Frischgewichtes (Frg)*

	Sproß-spitze	Blätter		Wurzel	Entwicklungszustand der Pflanzen
		junge	alte		
γ-Gluc/g Trg .	780	550	450	80	blühend
	400	620	330	80	blühend und fruchtend
	240	920	460	30	fruchtend
% Trg/Frg . .	17,0	15,5	11,0	15,0	blühend
	16,0	12,5	12,5	9,0	blühend und fruchtend
	18,0	16,0	12,0	7,0	fruchtend

Die Trockengewichte der einzelnen Organe blühender und fruchtender Pflanzen sind einander sehr ähnlich (Tabelle 9, untere Spalte). Das Trockengewicht sinkt in den in der Entwicklung fortgeschrittenen Pflanzen von den jungen zu den älteren Organen hin kontinuierlich ab. Wie zu erwarten, verringert sich der Trockensubstanzgehalt der Wurzeln reproduktiver Exemplare mit dem Altern der Pflanzen.

Es bleibt zu bemerken, daß die in den Blüten gegenüber den Blütenknospen gefundenen Eiweiß-, Aminosäure- und Glucosewerte wohl sicher durch die Pollenstäubung beeinflußt sind.

Teil III

Besprechung der Ergebnisse

Berücksichtigt man nur die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zusammengestellten Versuche zur experimentellen Beeinflussung der Blütenbildung, so scheint der Schluß berechtigt, daß sich die Blütenbildung der Zuckerrübe weder durch die Sachssche noch durch die Klebssche Theorie erklären läßt.

Die chemischen Untersuchungen, die an thermisch induzierten Zuckerrüben und Kontrollpflanzen durchgeführt wurden, geben jedoch einen gewissen Einblick in die Vorgänge beim Übergang in die sexuelle Reproduktion. Man könnte nun bei den vernalisierten Exemplaren charakteristische qualitative und quantitative Veränderungen der untersuchten Stoffe erwarten. Bei den Proteinen, freien Aminosäuren und Amiden sowie den freien Zuckern vernalisierter und Kontrollpflanzen ließen sich aber *keine qualitativen Differenzen* feststellen. Sie sind damit jedoch noch nicht ausgeschlossen, denn etwa neu gebildete Stoffe können in der Pflanze in so geringer Konzentration vorliegen, daß sie sich chemisch nicht nachweisen lassen. Dagegen konnten *quantitative Unterschiede* bei den untersuchten Stoffklassen zwischen vernalisierten und Kontrollpflanzen ermittelt werden.

So ist nach Abschluß der Vernalisation die Konzentration der löslichen, papierelektrophoretisch fraktionierbaren Eiweißkomponenten in den Blättern mittleren Alters erniedrigt. Dieser Befund kann 2 Ursachen haben, die möglicherweise miteinander verknüpft sind: eine gehemmte Eiweißsynthese oder eine verstärkte Hydrolyse der Proteine zu niedermolekulareren Verbindungen.

In den noch wachsenden Zuckerrübenblättern mittleren Alters wird unter günstigen Außenbedingungen die Proteinsynthese gegenüber der Eiweißhydrolyse verstärkt, der Synthese/Hydrolyse-Quotient also groß sein. Die Synthese dieser hochmolekularen Stoffe führt zur Bildung neuer Strukturensubstanzen, die für das Wachstum unerläßlich sind. Für die noch wachsenden Organe (z. B. Blätter mittleren Alters) sind aber während der Vernalisation sicher recht ungünstige Lebensbedingungen gegeben, zumindest in bezug auf den Baustoffwechsel. Deshalb ist wahrscheinlich die Synthese der Baustoffe gehemmt. Die hydrolytischen Prozesse werden hingegen offenbar nicht beeinflußt. Sie werden, im Gegenteil, teilweise sogar verstärkt (vgl. z. B. BORRISS 1952). Durch die Vernalisation wird also der Synthese/Hydrolyse-Quotient erniedrigt (OPARIN u. SENTSCHENKO 1949). Die Ansicht, daß durch die Vernalisation die Proteinhydrolyse verstärkt wird, wird auch durch die Untersuchungen POLSTERS (1938) an Weizen gestützt. Er berichtet von einem Eiweißabbau während der Vernalisation und vermutet, daß die thermische Induktion eine erhöhte Tätigkeit der proteolytischen

Enzyme bedingt. 1955 konnten Blagoveščenskij u. Kirillova diese Vermutung experimentell bestätigen.

Da die Vernalisation eine Konzentrationsabnahme der Eiweiße bedingt, wäre eine Erhöhung des Aminosäurengehaltes naheliegend. Die Konzentration der frei vorliegenden Aminosäuren weicht jedoch in den Zuckerrübenblättern nach Abschluß der Kältebehandlung vom Kontrollwert nicht ab. Auch bei anderen Pflanzenarten hat die Vernalisation keinen Einfluß auf den Aminosäurengehalt. So fand Napp-Zinn (1956), daß sich die alkohol- und chloroformlöslichen Aminosäuren vernalisierter *Arabidopsis*-Keimlinge nicht von denen entsprechender Kontrollexemplare unterscheiden. Auch bei der Wintergerste ist die Konzentration der freien Aminosäuren nach Abschluß der thermischen Induktion unverändert (Sparmann 1958). Somit scheint der Abbau der Proteine entweder nicht bis zur Aminosäurenstufe zu erfolgen (Konowalow u. Rogalew 1937) oder die bei der Eiweißhydrolyse frei werdenden Aminosäuren müßten weiter abgebaut, bzw. aus den Blättern abtransportiert werden; eine Entscheidung über diese 3 Möglichkeiten kann auf Grund meiner bisherigen Ergebnisse noch nicht getroffen werden.

Die Blätter vernalisierter Zuckerrüben zeichnen sich ferner — ähnlich wie vernalisierte Getreidekeimlinge (Lit. bei Hänsel 1953 und Augsten 1956) und kältebehandelter *Raphanus sativus* (Dupéron 1950) — durch einen erhöhten Glucosegehalt aus. Dupéron berichtet aber, daß der durch die thermische Induktion anfänglich erhöhte Kohlenhydratgehalt während der weiteren Entwicklung schnell wieder auf den Kontrollwert absinkt. *Die Zuckerrübe verhält sich jedoch anders, da bei ihr die Konzentration der reduzierenden Zucker (Glucose, Fructose) in den Blättern bis zum Blühbeginn stets über dem Kontrollwert liegt.*

Die Frage, ob die Konzentrationserhöhung der Glucose überhaupt für den Vernalisationseffekt bedeutungsvoll ist, wurde durch die Untersuchungen Mikhailowas (1949) beantwortet: Sie fand, daß ein Anstieg der Zuckerkonzentration auch bei Samen solcher Pflanzen auftritt, die sich zwar im Rosettenstadium, nicht aber im Keimlingsstadium mit Erfolg vernalisieren lassen. Danach scheint die Erhöhung des Zuckerspiegels eine unspezifische Folge der Kältebehandlung zu sein. Dafür spricht auch die Feststellung, daß sie in den Zuckerrübenblättern nicht nur bei der Vernalisation, sondern auch beim Kältetod eintritt.

Indes hat Purvis (1944) durch Zugabe von Zucker zum Nährmedium isolierter, vernalisierter Roggenembryonen eine Beschleunigung der Blütenbildung erreicht. Purvis schließt daraus, daß Kohlenhydrate — im Gegensatz zu der Feststellung Mikhailowas (1949) — für die erfolgreiche Vernalisation erforderlich sind.

Die durch die Vernalisation in den Zuckerrübenblättern bedingte Erhöhung des Glucosewertes bei konstantem Aminosäurengehalt und einer Verminderung der Eiweißkonzentration bedeutet eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses. Bei den Vorgängen, die zum Eintritt in die reproduktive Entwicklung führen, dürften sicherlich die in der Pflanze

frei vorliegenden, leicht transportablen, niedermolekularen Substanzen eine größere Rolle spielen als unlösliche, in den Organen deponierte hochmolekulare Stoffe. Deshalb wurde das C/N-Verhältnis allein aus der Konzentration der Glucose und der freien Aminosäuren und Amide berechnet. Dieses ist nach Abschluß der Vernalisation zunächst stark erhöht, sinkt bis zum mikroskopischen Schoßbeginn ab, um bei den induzierten Pflanzen mit dem makroskopisch sichtbar werdenden Schossen erneut anzusteigen (Abb. 10). Das hohe Kohlenhydrat/Stickstoff - Verhältnis nach Abschluß der Vernalisation deutet darauf hin, daß für die Blütenbildung der Zuckerrübe die Klebssche Theorie zutreffen könnte.

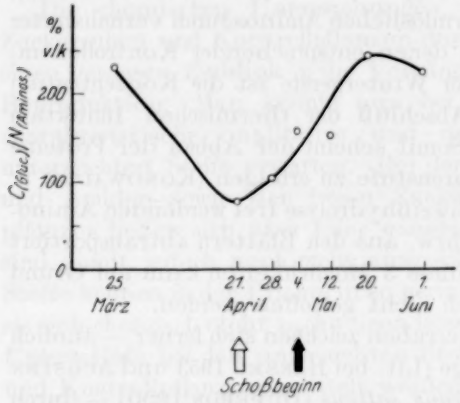


Abb. 10. Das C/N-Verhältnis (Glucose und freie Aminosäuren/Trockengewicht) in den Blättern mittleren Alters vernalisierter Zuckerrüben während der reproduktiven Entwicklung (in Prozent der nicht kältebehandelten Kontrollen)

Es ist nicht zu entscheiden, ob die beim Eintritt der Zuckerrübe in die reproduktive Entwicklung festgestellten stofflichen Veränderungen mit dem Schossen, mit der Blütenbildung oder mit beiden Vorgängen im Zusammenhang stehen. Auch ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob zwischen Schossen und Blütenbildung ein unmittelbarer Zusammenhang besteht. Gewisse Versuche und Beobachtungen deuten darauf hin, daß sich beide Vorgänge voneinander trennen lassen: In den vorliegenden Experimenten konnte ein Zuckerrübenexemplar beobachtet werden das blühte, ohne daß sich seine Achse wesentlich gestreckt hatte[1]. Außerdem fanden sich häufiger normal geschoßte Zuckerrüben, die nur vereinzelte Blüten ausbildeten. Ähnliches haben auch LANG u. MELCHERS (1943) sowie CLAUSS u. RAU (1956) von *Hyoscyamus* berichtet.

Schließlich ist es mir in späteren Versuchen gelungen, durch die Behandlung mit Gibberellinsäure bei nicht-vernalisierten Zuckerrüben zwar das Schossen, nicht aber die Blütenbildung auszulösen. Somit ergibt sich also jetzt die Möglichkeit, einen der beiden Vorgänge, die sich beim normalen Entwicklungsverlauf überlagern, allein zu untersuchen.

Zusammenfassung

A. Biochemische Methoden zur Fraktionierung der löslichen Eiweiße, freien Aminosäuren und Zucker der Zuckerrübe:

[1] Bei Clivien kann häufiger das „Sitzenbleiben" des Blütenstandes beobachtet werden.

1. Mit Hilfe der Hochspannungs-Papierelektrophorese gelingt es, den löslichen Eiweißkomplex der Zuckerrübe zu fraktionieren. In den Blatt- und Wurzelpreßsäften konnten je 4 Proteinkomponenten (A, B, C und D) festgestellt und teilweise quantitativ erfaßt werden.

2. Zur quantitativen papierchromatographischen Analyse der freien Zuckerrübenaminosäuren wurden Preßsäfte herangezogen. Zur Identifizierung der 7 papierchromatographisch getrennten Aminosäurengruppen wurde die Hochspannungs-Papierelektrophorese verwendet.

3. In Zuckerrübenblattpreßsäften konnten Glucose und Fructose, in den Preßsäften aus Wurzelmaterial Saccharose, Glucose und Fructose papierchromatographisch nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. Fructose und Saccharose geben mit den gebräuchlichsten Reagentien zum Nachweis von Indolderivaten eine Farbreaktion.

B. Quantitative Veränderungen der Eiweiße, Aminosäuren und Zukker beim Übergang zur Blütenbildung:

1. In den Blättern mittleren Alters bedingt die Vernalisation eine Abnahme der Konzentration der löslichen Proteine. Während der weiteren Entwicklung der Pflanzen verhalten sich die papierelektrophoretisch getrennten Komponenten B und C übereinstimmend. Ihre Konzentration liegt stets unter dem Kontrollwert; die Fraktion A hingegen steigt mit dem Schoßbeginn über den Kontrollwert an.

2. Die Konzentration der Aminosäuren — außer der Alaninfraktion — wird durch die Vernalisation in den Blättern nicht beeinflußt. Mit Ausnahme der Alanin- und Methioningruppe erreicht die Konzentration der freien Aminosäuren in den Blättern und Wurzeln beim Schoßbeginn einen Maximalwert und sinkt mit der weiteren Streckung der Achse wieder ab.

3. Durch die Vernalisation wird der Glucosegehalt der Blätter erhöht; während der weiteren Entwicklung der vernalisierten Pflanzen bleibt ihr Glucose- und Fructosegehalt stets über dem Kontrollwert.

4. Über die Verteilung der Eiweiße, freien Aminosäuren und Zucker in den einzelnen Organen der reproduktiven Pflanze wird berichtet.

Herrn Professor Dr. D. v. Denffer gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu dieser Arbeit und seine großzügige Unterstützung.

Literatur

Augsten, H.: Fermentaktivität und Atmung bei Sommergerste nach Kältebehandlung des Saatgutes. Wissenschaftliche Abhandlungen Nr 20. Berlin: Akademie-Verlag 1956.

Bennet-Clark, T. A., M. S. Tambiah and N. P. Kefford: Estimation of plant growth substances by partition chromatography. Nature (Lond.) **169**, 452—453 (1952).

*Blagoveščenskij, A. V., u. G. A. Kirillova: Der Einfluß zeitweiser Abkühlung auf den Stickstoffgehalt der Keim- und Endospermsubstanz von Winterweizen. Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. s. **100**, 171—173 (1955).

BORRISS, H.: Die physiologischen Grundlagen der Jarowisation. Die Deutsche Landwirtschaft, Sondernummer „Jarowisation" 1952.

BÜCHER, TH., D. MATZELT u. D. PETTE: Papierelektrophorese von Liquor cerebrospinalis. Klin. Wschr. **30**, 325—330 (1952).

CLAUSS, H., u. W. RAU: Über die Blütenbildung von *Hyoscyamus niger* und *Arabidopsis thaliana* in 72-Stunden-Zyklen. Z. Bot. **44**, 437—454 (1956).

CONSDEN, R., and A. H. GORDON: Effect of salt on partition chromatograms. Nature (Lond.) **162**, 180—181 (1948).

DUPÉRON, R.: Influence de la vernalization sur l'évolution des glucides au cours de la germination de *Raphanus sativus*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **230**, 225—227 (1950).

— Débat sur la vernalization. Bull. Soc. bot. France, Mémoires 1951, p. 67—81.

GORDON, S. A., and R. P. WEBER: Colorimetric estimation of Indoleacetic Acid. Plant Physiol. **26**, 192—195 (1951).

GRASSMANN, W., u. K. HANNIG: Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **290**, 1—27 (1952).

HÄNSEL, H.: Vernalisation (Jarowisation, Kältebestimmung). Forschungsergebnisse und ihre Verwertung in Pflanzenbau, Samenbau und Pflanzenzüchtung (Übersicht). Z. Pflanzenzücht. **32**, 233—274 (1953).

KANDLER, O.: Papierchromatographischer Nachweis der Aminosäurenausscheidung in vitro kultivierter Maiswurzeln. Z. Naturforsch. **6b**, 437—445 (1951).

*KONOWALOW, J. H., et J. E. ROGALEV: C. R. Acad. Sci. URSS. **16** (1937).

KORTÜM, G.: Kolorimetrie und Spektralphotometrie, 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1948.

LANG, A., u. G. MELCHERS: Die photoperiodische Reaktion von *Hyoscyamus niger*. Planta (Berl.) **33**, 653—702 (1943).

LEOPOLD, C. A., and F. S. GUERNSEY: Flower initiation in Alaska pea. I. Evidence as to the role of auxin. Amer. J. Bot. **40**, 46—50 (1953).

MADAN, CH. L.: Die Verteilung der freien Aminosäuren in der Pflanze und ihre Beeinflussung durch photoperiodische Induktion (Untersuchungen an *Kalanchoe bloßfeldiana*). Planta (Berl.) **47**, 53—80 (1956).

MELCHERS, G., u. A. LANG: Die Physiologie der Blütenbildung. Übersichtsbericht. Biol. Zbl. **67**, 105—174 (1948).

METZNER, H.: Unterschiede in der Eiweißfraktion bei Lang- und Kurztagexemplaren von *Kalanchoe bloßfeldiana*. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen **2b**, 19—22 (1954).

— Veränderungen der Blattproteine bei photoperiodischer Induktion. Planta (Berl.) **45**, 493—534 (1955).

*MIKHAILOWA, L. V.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR. **64**, 857—860 (1949). Zit. nach H. BORRISS, Die physiologischen Grundlagen der Jarowisation. Die Deutsche Landwirtschaft, Sondernummer „Jarowisation" 1952.

MOTHES, K., u. L. ENGELBRECHT: Über geschlechtsverschiedenen Stoffwechsel zweihäusiger einjähriger Pflanzen. I. Untersuchungen über den Stickstoffumsatz bei Hanf. Flora (Jena) **139**, 1—27 (1952).

NAPP-ZINN, K.: Zur Frage nach der Übertragbarkeit des durch die Vernalisation bewirkten Blühimpulses. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 193—198 (1956).

*OPARIN, A. J., u. W. A. SENTSCHENKO: 1949. Zit. nach H. BORRISS, Die physiologischen Grundlagen der Jarowisation. Die Deutsche Landwirtschaft, Sondernummer „Jarowisation" 1952.

OWEN, F. V.: Asexual propagation of sugar beets. J. Hered. **32**, 187—192 (1941).

Partridge, S. M.: Filter-paper partition chromatography of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. Biochem. J. **42**, 238—248 (1948).

— Anilin hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature (Lond.) **164**, 443 (1949).

Polster, H.: Kohlehydrat/Stickstoff-Verhältnis und Blütenbildung. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen zur Blühtheorie von Klebs. Beitr. Biol. Pflanz. **25**, 228—260 (1938).

Purvis, O. N.: Studies in the vernalisation of cereals. VIII. The role of carbohydrate and nitrogen supply in the vernalisation of excised embryos of "Petkus" winter rye. Ann. Botany, N. s. 8, 285—314 (1944).

Reggelin, H.: Über Eiweißstoffe und Aminosäuren in Zuckerrübenzellsaft. Diss. Braunschweig 1953.

Schneider, G.: Biochemische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen zur Frage des Schossens und der Blütenbildung der Zuckerrübe. I. Mitt. Versuche zur experimentellen Beeinflussung der Blütenbildung und chemische Untersuchungen zum Nachweis der freien β-Indolylessigsäure. Planta (Berl.). **55**, 669—868 (1960).

—, u. G. Sparmann: Über die Trennung von Pflanzenproteinen mit Hilfe der Hochspannungs-Papierelektrophorese. Naturwissenschaften **42**, 391 (1955).

Schneider, W., H. Nowakowski u. K. D. Voigt: Die Papierelektrophorese von menschlichem Spermaplasma. Klin. Wschr. **32**, 863—867 (1954).

Sparmann, G.: Morphologische und biochemische Untersuchungen an vernalisierten und nichtvernalisierten Gerstenpflanzen. Diss. Gießen 1958.

—, u. G. Schneider: Die Anwendung der Ultrafiltration zur Fraktionierung von Pflanzenpreßsäften und -extrakten. Naturwissenschaften **42**, 298 (1955).

Stout, M.: Relation of oxidation-reduction potential, respiration and catalase activity to induction of reproductive development in sugar beets. Bot. Gaz. (Chicago) **110**, 438—449 (1949).

Virtanen, A., and T. Laine: Amino acid content of plants at different stages of growth. Nature (Lond.) **137**, 237 (1936).

Von den durch * gekennzeichneten Arbeiten standen mir lediglich Referate zur Verfügung.

Dr. Gerold Schneider,
Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität,
Köln-Lindenthal, Kerpener Straße 15

Planta 56, 348—356 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Erlangen

KEIMVERSUCHE AUF GENETISCHER GRUNDLAGE

IV. PRÄDETERMINATION DER LICHTBEDÜRFTIGKEIT DER SAMEN UND DES KEIMVERLAUFES

Von

J. SCHWEMMLE

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. November 1960)

In einer früheren Mitteilung hatte durch Kreuzungen verschiedener Formen der *Oenothera Berteriana*, einer isogamen Komplexheterozygote mit den Komplexen B und *l*, bei denen der *l*-Komplex gewissermaßen markiert gewesen war, gezeigt werden können, daß die *l*·B-Samen langsamer keimten als die B·*l*-Samen. Der durch die Eizellen vererbte Komplex steht dabei an erster Stelle. Daraus wurde gefolgert, daß der *l*-Komplex die Eizelle im Embryosack der Samenanlagen zu einer langsameren Keimung der aus der Befruchtung durch B-Schläuche entstandenen Embryonen bzw. Samenanlagen prädeterminiert. Spätere Untersuchungen, über die kürzlich berichtet wurde, haben dann ergeben, daß der *l*-Komplex stärker als der B-Komplex den Keimverlauf verlangsamt. Dieser Befund stützte die obige Annahme einer Prädetermination. Es war aber doch wünschenswert, die Frage noch einmal anzugehen, zumal es sich hatte zeigen lassen, daß der *l*-Komplex die stärkste Lichtbedürftigkeit der Samen bei der Keimung bewirkt. Möglicherweise prädeterminiert der *l*-Komplex auch in dieser Hinsicht die Eizelle.

Die Versuche, über die nachfolgend berichtet wird, wurden vom 3. 12. 56 bis 18. 11. 57 durchgeführt. Sie wurden ermöglicht durch die Unterstützung von seiten der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Dafür danke ich sehr, ebenso Fräulein Dr. RICHTER für ihre Mithilfe.

Material und Methode

Keimversuche mit Samen aus den Kreuzungen $B \cdot l_t \times B \cdot II$ und $B \cdot l_t \times l_t \cdot II$ schienen für die Beantwortung der gestellten Frage am besten geeignet. $B \cdot II$ und $l_t \cdot II$ sind halbheterogame Komplexheterozygoten, bei denen durch den Pollen nur der Komplex B bzw. l_t vererbt wird. Aus der Kreuzung $B \cdot l_t \times B \cdot II$ erhalten wir $B \cdot B$ und $l_t \cdot B$. Da die $B \cdot B$-Embryonen absterben und die Samen mit solchen taub sind, werden im Keimversuch nur Samen mit $l_t \cdot B$-Embryonen, kurz gesagt $l_t \cdot B$-Samen, geprüft. In der Kreuzung $B \cdot l_t \times l_t \cdot II$ entstehen fast ausschließlich $B \cdot l_t$. Die wegen der geringen Affinität der l_t-Samenanlagen zu den l_t-Pollenschläuchen nur zu einem geringen Prozentsatz entstehenden und bald absterbenden $l_t \cdot l_t$ stecken in den tauben Samen. Es wird also die Keimung der $l_t \cdot B$- und $B \cdot l_t$-Samen verglichen. Deren Embryonen sind in ihrer genetischen Konstitution völlig

identisch. Aber die einen sind aus *l*-Eizellen, die anderen aus B-Eizellen entstanden. Da alle Kreuzungen mit $B \cdot l_t$-♀♀ gemacht wurden, ist ein etwaiger Einfluß des mütterlichen Diplonten bei beiden Samensorten der gleiche.

Es wäre gewiß wünschenswert gewesen, nicht die $B \cdot l_t$ mit ungetupften Petalen, bei der das *l* 2-Chromosom mit dem Tupfungsfaktor T gegen das I 2-Chromosom ohne diesen ausgetauscht ist, zu verwenden, sondern die ursprüngliche *Oe. Berteriana* ($B \cdot l_T$) mit getupften Petalen. Denn es hatte sich gezeigt, daß auch das $l\,2_T$-Chromosom einen starken Einfluß auf den Keimverlauf und die Lichtbedürftigkeit der Samen hat. Deshalb war zu vermuten, daß der Komplex l_T stärker prädeterminiert als l_t. Aus der Kreuzung $B \cdot l_T \times B \cdot II$ bekämen wir nur $l_T \cdot$B-Samen. Aber aus der Kreuzung $B \cdot l_T$ mit der $l \cdot II_{Tt}$ mit getupften Petalen würden wir wegen der hier vorhandenen Spaltung — bedingt durch das Chromosomenpaar $\binom{l\,2_T}{I\,2_t}$ — $B \cdot l_T$- und $B \cdot l_t$-Samen erhalten, also ein uneinheitliches Samenmaterial. Deshalb mußte mit $B \cdot l_t$ ♀ gekreuzt werden.

Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Versuche ist, daß der B- bzw. l_t-Komplex der beiden ♂♂ $B \cdot II$ und $l_t \cdot II$ identisch ist mit den Komplexen der als ♀♀ verwendeten $B \cdot l_t$. Das ist gemäß dem Stammbaum der für die Kreuzungen verwendeten Formen, welcher hier nicht wiedergegeben wird, sicher der Fall. Besser wäre es allerdings gewesen, aus der Kreuzung $B \cdot II \times l_t \cdot II$ eine $B \cdot l_t$ zu bekommen und mit dieser als ♀ zu kreuzen. Aber das wurde zu spät bedacht. Die Kreuzungen wurden 1955 und 1956 gemacht und zwar jeweils gleichzeitig. Damit ist die Möglichkeit, daß eine unterschiedliche Keimung durch verschieden alte Samen bedingt ist, ausgeschaltet. Die Versuchsanordnung ist an anderer Stelle beschrieben. Die Temperatur in den Thermostaten schwankte um $\pm 0{,}1^\circ$ C. Durch Einbau eines Stabilisators war auch dafür gesorgt, daß sich nicht durch Schwankungen im Stromnetz die Lichtintensität änderte. Das muß im Hinblick auf die großen Schwankungen der Keimprozente noch einmal erwähnt werden. In den 1×10 Std 300 Lux-Versuchen wurden die am 1. Versuchstag um 8 Uhr angefeuchteten Samen am 2. Tag von 8—18 Uhr mit 300 Lux belichtet, in den 2×10 Std-Versuchen am 1. und 2. Tag jeweils von 8—18 Uhr. Die gekeimten Samen wurden täglich ausgezählt, damit auch der Verlauf der Keimung erfaßt werden konnte. Nach 10 Tagen war die Keimung zu Ende. Die Schalen mit den ungekeimten Samen wurden vor einem Südfenster aufgestellt. Durch diese Nachkeimung sollte das höchstmögliche Keimprozent ermittelt werden. Einige ergänzende Versuche werden an geeigneter Stelle besprochen. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Keimversuche zur Bestimmung der Lichtbedürftigkeit der $l_t \cdot$B- und $B \cdot l_t$-Samen behandelt, dann der Verlauf der Keimung.

Die Keimversuche

A. Die Versuche mit Samen des Jahres 1955

Die Kreuzungen $B \cdot l_t \times B \cdot II$ und $B \cdot l_t \times l \cdot II$ waren in der Zeit vom 27. bis 29. 7. 55 gemacht worden. Als am 3. 12. 56 der 1. Keimversuch angesetzt wurde, waren seitdem etwa 490 Tage, bei dem letzten Versuch am 9. 5. 57 gar 647 Tage vergangen. Die Samen waren also recht alt. Für jeden Versuch wurden 300—500 Samen verwendet. Nach Abschluß der Versuche wurde durch Zerdrücken der nicht gekeimten Samen festgestellt, wie viele taub waren. Von den 8757 Samen aus allen $B \cdot l \times$ $B \cdot II$-Kreuzungen waren $3632 = 41{,}5\,\%$ taub. In diesen steckten haupt-

sächlich die nicht lebensfähigen B·B-Homozygoten. Der hohe Anteil zeigt, daß die B-Samenanlagen sehr häufig von den B-Pollenschläuchen befruchtet wurden. Von den 6047 Samen aus den $B \cdot l_t \times l_t \cdot II$-Kreuzungen waren dagegen nur 301 = 5,0% taub. Die l-Samenanlagen werden durch die l-Schläuche nicht häufig befruchtet; die Affinität zwischen beiden ist gering. Das hatten ja frühere Untersuchungen schon ergeben. Die Keimprozente wurden natürlich nur auf die ausgelegten vollen Samen bezogen. Diese keimten in den beiden Dauerlichtversuchen und bei der Nachkeimung zu 97,4—100%, also sehr gut. Dabei ist es gleichgültig, ob die Samen aus den $B \cdot l_t \times B \cdot II$- oder den $B \cdot l_t \times$

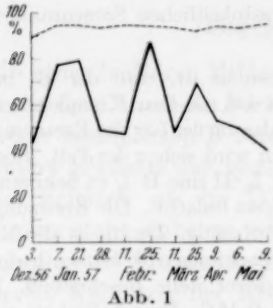


Abb. 1

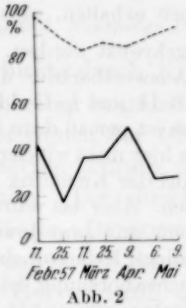


Abb. 2

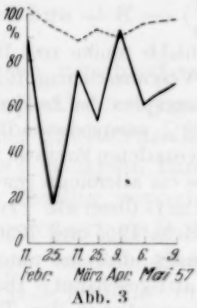


Abb. 3

Abb. 1. % Keimung bei den 2 × 10 Std-Versuchen der Ernte 1955.
——— $l_t \cdot B$ aus den Kreuzungen $B \cdot l_t \times B \cdot II$
-------- $B \cdot l_t$ aus den Kreuzungen $B \cdot l_t \times l_t \cdot II$

Abb. 2. % Keimung bei den 1 × 10 Std-Versuchen der Ernte 1955. ——— $l_t \cdot B$, -------- $B \cdot l_t$

Abb. 3. $\frac{(\%\ 1 \times 10\ \text{Std}) \times 100}{(\%\ 2 \times 10\ \text{Std})}$ ——— $l_t \cdot B$ -------- $B \cdot l_t$ Ernte 1955

$l_t \cdot II$-Kreuzungen stammten. Deshalb können die bei den Versuchen erhaltenen Keimprozente unmittelbar als Maß für die Lichtbedürftigkeit der Samen verwendet werden.

a) Die 2 × 10 Std-Versuche. 11 Versuche wurden vom 3. 12. 56 bis 9. 5. 57 gemacht. Wann sie angesetzt wurden, ist aus der Abb. 1 zu entnehmen. Sie zeigt auch, daß die Samen aus den $B \cdot l_t \times l_t \cdot II$-Kreuzungen mit $B \cdot l_t$-Embryonen, entstanden durch Befruchtung der B-Eizellen durch die l_t-Schläuche, zu 89,4—94,5% keimten, also fast so gut wie bei den Dauerlichtversuchen und der Nachkeimung. Die Schwankungen sind sehr gering. Demgegenüber keimten die Samen aus den $B \cdot l_t \times B \cdot II$-Kreuzungen mit $l_t \cdot B$-Embryonen schlechter. Ganz auffallend sind die großen Schwankungen, die nicht erklärbar sind. Jedenfalls aber sind die $l_t \cdot B$-Samen lichtbedürftiger als die $B \cdot l_t$-Samen.

b) Die 1 × 10 Std-Versuche. Wenn schon die Unterschiede bei den vorbesprochenen Versuchen eindeutig waren, konnte es doch sein, daß sie bei geringerer Belichtung noch größer ausfallen würden. Deshalb wurden vom 11. 2. 57 ab 7 Parallelversuche angesetzt, bei denen die Samen erst am 2. Tag von 8—18 Uhr belichtet wurden. Die $B \cdot l_t$-Samen aus den $B \cdot l_t \times l_t \cdot II$-Kreuzungen keimten auch unter diesen Bedingungen

noch sehr gut. Der Durchschnittswert von 89,1% ist nicht viel niedriger als bei den 7 Parallelversuchen mit längerer Belichtung mit 94,0%. Bei den 3 Versuchen vom 11. 3. bis 9. 4. 57 keimten die Samen zu 83,5%, 86,7% und 84,9%. Wodurch diese Depression im Kurvenverlauf bedingt ist, kann ebensowenig erklärt werden wie die viel größeren Schwankungen in der Keimung bei den l_t·B-Samen aus den Kreuzungen B·l_t × B·II. Sicher sind diese wiederum viel lichtbedürftiger als die B·l_t-Samen (Abb. 2).

Das ist auch der Fall bei den nur anhangsweise erwähnten Versuchspaaren. Am 28. 1. 57, dem 1. Versuchstag, wurden die Samen 10 Std belichtet, dann, weil sie nicht keimten, noch einmal am 5. Tag 8 Std. Am 10. Tag hatten die B·l_t-Samen zu 67,7%, die l_t·B-Samen aber zu nur 1,4% gekeimt. Bei den am 11. 2. 57 angesetzten Versuchen wurden die Samen am 2. Tag 15 Std lang belichtet. Am 10. Tag hatten die B·l_t-Samen zu 93,5%, die l_t·B-Samen zu 71,8% gekeimt.

Alle 20 Versuchspaare hatten also das gleiche Ergebnis: Die l_t·B-Samen aus den B·l_t × B·II-Kreuzungen keimten unter den gleichen Bedingungen schlechter, waren also lichtbedürftiger als die B·l_t-Samen aus den B·l_t × l_t·II-Kreuzungen. Das ist überraschend, denn die l_t·B-Embryonen haben genau die gleichen Komplexe wie die B·l_t-Embryonen. Auch ein Einfluß des mütterlichen Diplonten ist hier ausgeschlossen, denn stets wurde ja mit B·l_t-♀♀ gekreuzt.

Nun wissen wir aus anderen Versuchen einmal, daß der Komplex l die stärkste Lichtbedürftigkeit bedingt, zum anderen, daß er den Keimverlauf prädeterminiert. Die unterschiedliche Lichtbedürftigkeit der l_t·B- und B·l_t-Samen können wir wie folgt erklären: Der Eizellkern mit dem l_t-Komplex produziert Stoffe, die sich vielleicht im Plasma autokatalytisch vermehren und die bewirken, daß die Lichtbedürftigkeit der aus der Kreuzung erhaltenen l_t·B-Samen bei der Keimung erhöht wird. Für die Eizellkerne mit dem B-Komplex gilt vermutlich Entsprechendes. Aber diese, sagen wir kurz B-Stoffe, sind weniger wirksam als die l-Stoffe, denn der B-Komplex bedingt ja geringere Lichtbedürftigkeit als der l-Komplex. Deshalb sind dann die B·l_t-Samen auch weniger lichtbedürftig. Daß der bei den l_t- und B-Eizellen vorhandene Unterschied bei den l_t·B- und B·l_t-Samen erhalten bleibt, und zwar viele Monate lang, ist gewiß verwunderlich. Wenn übrigens die Erklärung richtig ist, dann keimen möglicherweise bestimmte Testsamen auf Extrakten von l·B-Samen schlechter als auf solchen von B·l-Samen. Die bislang durchgeführten Versuche haben kein eindeutiges Ergebnis gebracht. Sie werden fortgesetzt.

c) Vergleich der 1 × 10 Std- und 2 × 10 Std-Versuche. Vergleichen wir die Abb. 1 und 2, so sehen wir, daß die B·l_t-Samen in den 7 1 × 10 Std-Versuchen nicht viel schlechter gekeimt haben als in den gleichzeitig angesetzten 2 × 10 Std-Versuchen, in dem Versuch vom 11. 2. 57 sogar

besser. Wir können nun die Versuchswerte bei den 1×10 Std-Versuchen auf diejenigen bei den 2×10 Std-Versuchen beziehen, die wir gleich 100% setzen. So erhalten wir die Werte für die Kurve der Abb. 3. Diese zeigt deutlich, daß bei den Versuchen mit kürzerer Belichtung die Keimung nicht viel schlechter war. Im Durchschnitt ist sie von 100% auf 94,8% abgesunken.

Bei den $l_t \cdot$B-Samen fallen in beiden Versuchsreihen die großen Schwankungen auf, die aber nicht gleichsinnig verlaufen (Abb. 1 u. 2). So keimten die $l_t \cdot$B-Samen in dem 2×10 Std-Versuch vom 25.2. am besten (87,3%), in dem am gleichen Tag angesetzten 1×10 Std-Versuch aber am schlechtesten. Wodurch diese Schwankungen bedingt sind, ist unerfindlich. Selbstverständlich wurden alle Fehlermöglichkeiten bedacht und auf möglichste Konstanz der Versuchsbedingungen geachtet. Aber wie sonst ließen sich auch bei diesen Versuchen die Schwankungen nicht vermeiden. Zu wieviel Prozent die $l_t \cdot$B-Samen bei den 1×10 Std-Versuchen gegenüber den 2×10 Std-Versuchen, deren Werte, wie oben ausgeführt, = 100% gesetzt wurden, gekeimt haben, zeigt Abb. 3. Nur bei dem Versuch vom 9. 4. ist bei den $l_t \cdot$B-Samen die Abnahme so wie bei den $B \cdot l_t$-Samen, sonst aber größer. Im Durchschnitt ist die Keimung von 100% auf 60,1% abgesunken. Die $l_t \cdot$B-Samen reagieren demzufolge auf die geringere Belichtung viel stärker als die gleich konstituierten $B \cdot l_t$-Samen.

B. Die Versuche mit Samen des Jahres 1956

Die gleichen Kreuzungen waren vom 30. 7. bis 9. 8. 56 noch einmal gemacht worden. Mit den Versuchen wurde am 25. 3. 57 begonnen. Die Samen keimten bei den 2×10 Std- und 1×10 Std-Versuchen bis zum 4. Versuch am 9. 5. 57 nicht gut. Sie waren noch nicht alt genug, obwohl seit dem Kreuzen etwa 230—280 Tage verstrichen waren. Deshalb wurden erst wieder am 7. 10. 57 Versuche angesetzt und in kurzen Abständen bis zum 10. Versuch am 11. 11. 57 fortgeführt (s. Abb. 4. u. 5). Seit dem Kreuzen waren etwa 428—463 Tage vergangen. Die Schalen mit den in den Keimversuchen nicht gekeimten Samen wurden ans Fenster zur Nachkeimung gestellt. Die oberen Kurven der Abb. 4 und 5 zeigen, daß die so ermittelte Gesamtkeimung bis auf den einen Versuch vom 4. 11. sehr gut war. Wir können also die Keimprozente der Versuche wieder unmittelbar miteinander vergleichen. Da die tauben Samen beim Reinigen in der Maschine abgeblasen worden waren, kann ihr prozentualer Anteil incht angegeben werden.

a) Die 2×10 Std-Versuche. Bei den ersten 4 Versuchen war die Keimung der $l_t \cdot$B-Samen mit 0,7—4,3% noch schlecht. Bei den späteren mit den älter gewordenen Samen stieg sie von 6,3% bei dem am 7. 10. 57 angesetzten Versuch stetig an bis zu 18,5% bei dem Versuch vom 4. 11., um dann wieder etwas abzunehmen (Abb. 4). Mit zunehmendem Alter

nimmt die Lichtbedürftigkeit der Samen ab. Noch ausgesprochener ist das bei den Versuchen mit den B·l_t-Samen der Fall. Sie keimten mit 12,2—79,7% durchweg besser als die l_t·B-Samen, bei denen die größere Lichtbedürftigkeit durch den l_t-Komplex prädeterminiert ist. Diesmal haben wir bei den B·l_t-Samen große Schwankungen.

b) Die 1 × 10 Std-Versuche. Bei beiden Samensorten war bei diesen Versuchsbedingungen die Keimung schlechter (Abb. 5). Bei den 4 Versuchen vom 25. 3. bis 9. 5. 57 keimten die l_t·B-Samen durchschnittlich nur zu 0,8%, bei den späteren Versuchen mit geringen Schwankungen zu 2,0—6,8%. Wieder keimten die B·l_t-Samen besser, in den ersten

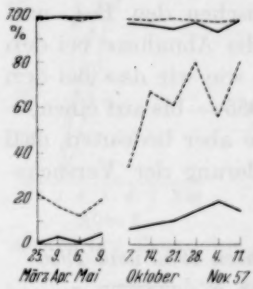


Abb. 4

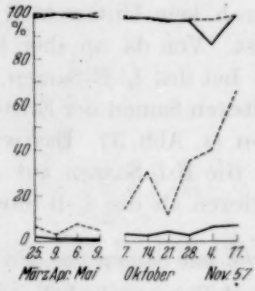


Abb. 5

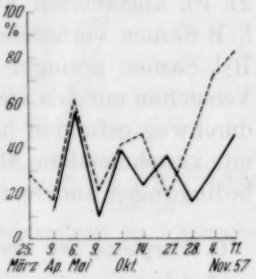


Abb. 6

Abb. 4. Untere Kurven: % Keimung bei den 2 × 10 Std-Versuchen der Ernte 1956. Obere Kurven: Nachkeimung. ——— l_t·B; ----·---- B·l_t

Abb. 5. Untere Kurven: % Keimung bei den 1 × 10 Std-Versuchen der Ernte 1956. Obere Kurven: Nachkeimung. ——— l_t·B; -------- B·l_t

Abb. 6. $\frac{(\%\ 1\times 10\ \text{Std})\times 100}{(\%\ 2\times 10\ \text{Std})}$ ——— l_t·B -------- B·l_t Ernte 1956

4 Versuchen durchschnittlich zu 5,3%. Bei den Versuchen ab 7. 10. stieg die Keimung bis zu 64,6% an. Die Schwankungen entsprechen denjenigen bei den 2 × 10 Std-Versuchen. Wodurch sie bedingt sind, ist unbekannt.

Die unterschiedliche Keimung der B·l_t- und l_t·B-Samen war auch sonst noch festzustellen. In 2 am 18. 11. angesetzten Versuchen wurden die Samen am 2. Tag ab 8 Uhr 25 Std mit 300 Lux belichtet. Nach 10 Tagen hatten die B·l_t-Samen zu 89,7%, die l_t·B-Samen zu 78,6% gekeimt. In 2 weiteren, ebenfalls am 18. 11. angesetzten Versuchen, waren die Samen schon am 1. Tag 10 Std belichtet worden, am 2. Tag dann so wie bei den vorigen Versuchen. Nach 10 Tagen hatten 94,2% und 83,1% der Samen gekeimt. Die Belichtung am 1. Tag hatte sich nur geringfügig ausgewirkt, weil die Samen ja erst noch quellen mußten. In 2 weiteren Versuchspaaren vom 28. 10. und 4. 11. waren die Samen am 2. und 3. Tag je 10 Std belichtet worden. Die B·l_t-Samen hatten zu 84,2% und 89,5%, die l_t·B-Samen zu 60,5% und 57,8% gekeimt. Wie man sieht, haben die l_t·B-Samen auf die geänderten Versuchsbedingungen viel stärker angesprochen als die B·l_t-Samen.

Jedenfalls haben bei insgesamt 24 Vergleichsversuchen mit Samen der Ernte 1956 die offensichtlich lichtbedürftigeren l_t·B-Samen schlechter

gekeimt als die B·l_t-Samen. Die Ergebnisse der Versuche mit Samen der Ernte 1955 konnten in vollem Umfang bestätigt werden.

c) Vergleich der 1 × 10 Std- und 2 × 10 Std-Versuche. Da die je 10 Versuche mit den beiden Samensorten bei verschiedener Belichtungsdauer an den gleichen Tagen angesetzt wurden, kann man sie vergleichen und feststellen, wie sich die verschiedenen Bedingungen ausgewirkt haben. Die Werte für die Kurven der Abb. 6 wurden in der bereits oben angegebenen Weise berechnet (s. S. 352). Aus ihr kann man entnehmen, wie die Keimung bei den 1 × 10 Std-Versuchen gegenüber den 2 × 10 Std-Versuchen abgenommen hat. Auffallend ist nun, daß bis zu dem am 21. 10. angesetzten Versuch kein Unterschied zwischen den B·l_t- und l_t·B-Samen vorhanden ist. Von da an aber ist die Abnahme bei den B·l_t-Samen geringer als bei den l_t·B-Samen, so wie wir das bei den Versuchen mit den viel älteren Samen der Ernte 1955 — bis auf einen — durchweg gefunden haben (s. Abb. 3). Das würde aber bedeuten, daß mit zunehmendem Alter die B·l_t-Samen auf Änderung der Versuchsbedingungen anders reagieren als die l_t·B-Samen.

C. Vergleich der Versuche mit Samen aus den Jahren 1955 und 1956

Leider waren nur an 4 Tagen, nämlich am 25. 3., 9. 4., 6. 5. und 9. 5. 57, Parallelversuche mit Samen der beiden Ernten angesetzt worden. Die Abb. 7 mit den Versuchswerten zeigt deutlich, wieviel weniger lichtbedürftig die um ein Jahr älteren Samen aus dem Jahre 1955 waren. Ob die relative Abnahme bei den B·l_t- und l_t·B-Samen verschieden ist, kann bei den wenigen Vergleichsversuchen nicht gesagt werden. Groß ist der Unterschied keinesfalls.

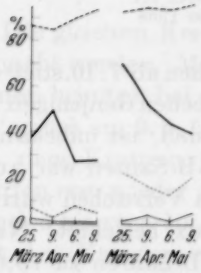


Abb. 7. Vergleich der Keimung mit Samen der Ernte 1955 und 1956.
links: 1 × 10 Std —— l_t·B ------ B·l_t 1955
rechts: 2 × 10 Std —— ------ 1956

In insgesamt 44 Versuchspaaren mit Samen aus Kreuzungen der Jahre 1955 und 1956 ist also nachgewiesen worden, daß die l_t·B-Samen aus den Kreuzungen B·l_t × B·II lichtbedürftiger sind als die B·l_t-Samen aus den Kreuzungen B·l_t × l_t·II. Am einfachsten kann dieser Befund mit Prädetermination der Eizellen durch den Kern mit dem Komplex l, der große Lichtbedürftigkeit bedingt, erklärt werden.

Der Keimverlauf

Da die gekeimten Samen jeden Tag ausgezählt wurden, konnte der Keimverlauf verfolgt und geprüft werden, ob in Bestätigung früherer Versuche auch der Keimverlauf durch den Komplex l_t prädeterminiert wurde. In diesem Fall müßten die l_t·B-Samen langsamer keimen als die

$B \cdot l_t$-Samen. Zunächst werden die Versuche mit Samen aus dem Jahre 1955 beschrieben, dann diejenigen mit Samen des Jahres 1956.

a) Die Versuche mit Samen des Jahres 1955. Für jedes der 20 Versuchspaare mit $l_t \cdot B$- und $B \cdot l_t$-Samen wurden die Summenkurven gezeichnet. Aus ihnen kann abgelesen werden, wieviel Prozent der am 10. Tag insgesamt gekeimten Samen bis zum 4., 5. usw. Versuchstag gekeimt haben. In jedem Fall keimten die $l_t \cdot B$-Samen langsamer als die $B \cdot l_t$-Samen. Da aber in den Einzelversuchen die Zahl der Keim-

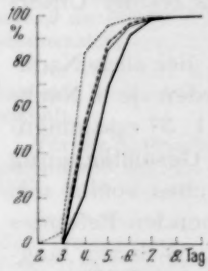


Abb. 8

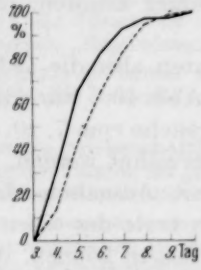


Abb. 9

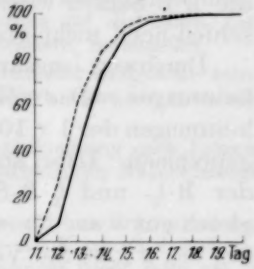


Abb. 10

Abb. 8. Der Keimverlauf bei den Samen der Ernte 1955. Durchschnitt der 7 Versuche vom 11. 2. bis 9. 5. 57.

——— $l_t \cdot B$ 407 gek. Sa. } 1 × 10 Std-Versuche
------ $B \cdot l_t$ 1384 gek. Sa. }
——— $l_t \cdot B$ 955 gek. Sa. } 2 × 10 Std-Versuche
-------- $B \cdot l_t$ 1729 gek. Sa. }

Abb. 9. Der Keimverlauf bei den 2 × 10 Std-Versuchen der Ernte 1956. Durchschnitt der 3 Versuche vom 28. 10. bis 11. 11. 57. ——— $l_t \cdot B$ 133 gek. Sa. -------- $B \cdot l_t$ 655 gek. Sa.

Abb. 10. Der Keimverlauf bei der Nachkeimung der 1 × 10 Std-Versuche. Ernte 1956. Durchschnitt der 6 Versuche vom 7. 10. bis 11. 11. 57. ——— $l_t \cdot B$ 1744 gek. Sa. -------- $B \cdot l_t$ 1247 gek. Sa.

linge nicht groß war, wurden für die Kurven der Abb. 8 je 7 Versuche vom 11. 2. bis 9. 5. 57 zusammengenommen. Abb. 8 zeigt, daß bei den 1 × 10 Std-Versuchen die $B \cdot l_t$-Samen schneller keimten als die $l_t \cdot B$-Samen. So ist es auch bei den 2 × 10 Std-Versuchen. Nur ist bei diesen Versuchsbedingungen der Keimverlauf so beschleunigt, daß nunmehr die $l_t \cdot B$-Samen fast so schnell keimen wie die $B \cdot l_t$-Samen bei den 1 × 10 Std-Versuchen.

Selbst bei den 2 sog. Optimalversuchen mit Dauerlicht, bei denen die Keimprozente gleich waren (99,4 und 98,7% bei den $l_t \cdot B$-Samen, 99,5 und 99,0% bei den $B \cdot l_t$-Samen), ist der Unterschied vorhanden, wenn er auch sehr gering ist. Nimmt man die je 2 Versuche zusammen, so haben bis zum 3. und 4. Tag gekeimt: von den $B \cdot l_t$-Samen 6,0% und 92,1%, von den $l_t \cdot B$-Samen etwas weniger, nämlich 0,5% und 85,8%.

b) Die Versuche mit Samen des Jahres 1956. Bei den 1 × 10 Std-Versuchen hatten zu wenig Samen gekeimt, ebenso bei den meisten 2 × 10 Std-Versuchen. Nur für die 3 Versuche vom 28. 10. bis 11. 11. 57 konnte der Keimverlauf ermittelt werden. Auffallenderweise keimten,

wie Abb. 9 zeigt, entgegen allen Erwartungen die B·l_t-Samen langsamer als die l_t·B-Samen, die an sich viel schlechter gekeimt hatten (Abb. 4), weil sie lichtbedürftiger waren. So überraschend und allen sonstigen Ergebnissen widersprechend dieser Befund ist, so zeigt er doch, daß die an sich naheliegende Annahme, daß die lichtbedürftigeren Samen unter allen Umständen langsamer keimen müßten, nicht durchweg zu Recht besteht. Auffallend ist nun, daß bei den 2 Versuchspaaren vom 28. 10. und 4. 11., bei denen am 2. und 3. Tag je 10 Std belichtet worden war, die l_t·B-Samen wieder langsamer keimten. Allerdings ist der Unterschied noch nicht groß.

Durchweg langsamer keimten aber die l_t·B-Samen bei allen Nachkeimungen. Das zeigt die Abb. 10. Für diese wurden je 6 Nachkeimungen der 1×10 Std-Versuche vom 7. 10. bis 11. 11. 57 zusammengenommen. Dabei soll noch erwähnt werden, daß die Gesamtkeimung der B·l_t- und l_t·B-Samen mit Ausnahme des Versuches vom 4. 11. gleich gut war. So wird man trotz des einen abweichenden Befundes bei den 2×10 Std-Versuchen sagen können, daß die l_t·B-Samen langsamer keimen als die B·l_t-Samen, und zwar vermutlich nicht deshalb, weil die l_t·B-Samen lichtbedürftiger sind, sondern weil der langsamere Verlauf der Keimung durch den l-Komplex prädeterminiert ist.

Zusammenfassung

1. Die Samen mit l_t·B-Embryonen aus den Kreuzungen B·$l_t \times$ B·II der Jahre 1955 und 1956 sind bei der Keimung viel lichtbedürftiger als die Samen mit den gleich konstituierten B·l_t-Embryonen aus den Kreuzungen B·$l_t \times l_t$·II. Dieser Befund wird damit erklärt, daß der starke Lichtbedürftigkeit bewirkende Komplex l im Kern der Eizelle diese prädeterminiert.

2. Auf Änderungen der Versuchsbedingungen sprechen die über ein Jahr alten l_t·B-Samen stärker an als die B·l_t-Samen.

3. Je älter die Samen werden, desto mehr nimmt ihre Lichtbedürftigkeit bei der Keimung ab.

4. Zumeist keimen die l_t·B-Samen langsamer als die B·l_t-Samen. Auch der Keimverlauf wird durch den l-Komplex prädeterminiert.

Literatur

Haustein, E.: Die Endenbezifferung der Chromosomen einiger Oenotheren aus dem Subgenus Raimannia. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 84, 417—453 (1952).

Schwemmle, J.: Prädetermination des Keimverlaufes bei *Oenothera Berteriana*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 84, 568—574 (1952).

— Keimversuche auf genetischer Grundlage. I. Die Lichtabhängigkeit. Planta (Berl.) 54, 294—313 (1960).

— Keimversuche auf genetischer Grundlage. II. Genetische Konstitution und Keimverlauf. Flora (Jena) (im Druck).

Prof. Dr. J. Schwemmle, Erlangen,
Botanisches Institut der Universität, Schloßgarten 3

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigung bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Vorläufige Mitteilungen werden nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellungen der Tatbestände ist zulässig.

II. Formelle Anforderungen

Originalarbeiten sollen nicht umfangreicher als zwei Druckbogen (à 16 Druckseiten) sein; Kurze Mitteilungen dürfen den Umfang von vier Druckseiten nicht überschreiten.

Das Manuskript muß leicht leserlich und einseitig geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzureichen, ebenso die Legenden. Die Arbeiten müssen knapp und sprachlich klar geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. *Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen* (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) *herzustellen.*

Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

Für die Rechtschreibung ist die „wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt.

Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse anzufügen. Eine Übersetzung dieser Zusammenfassung in eine andere der Kongreß-Sprachen kann in Petit-Druck hinzugefügt werden, sofern beide Zusammenfassungen nicht mehr als insgesamt $1^1/_2$ Druckseiten beanspruchen.

Von jeder Versuchsart bzw. von jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text, oder wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen und angefordert werden kann.

Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige zu beschränken. Knappe Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Unzulässig ist die doppelte Darstellung in Tabelle *und* Kurve. Für Halbtonbilder (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind reproduktionsfähige, d.h. scharfe, gut durchgezeichnete und tonwertreiche Vorlagen (Hochglanzabzüge) einzureichen. Die Beschriftung der Abbildungen mit Buchstaben und/oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise sind auf einem über die Vorlage geklebten Deckblatt einzureichen. Für schematische Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzungen reproduziert werden sollen, sind saubere, klare Skizzen abzuliefern, die vom Verlag umgezeichnet werden.

Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel (in der Abkürzung nach den World Medical Periodicals), Band-, Seiten- und Jahreszahl. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen (jeweils mit Anfangsbuchstaben des Vornamens) *alphabetisch* anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und weniger wichtigen Teilen ist für Kleindruck vorzumerken. Autorennamen sollen (für KAPITÄLCHEN-Druck) doppelt, lateinische Namen der Objekte (für *Kursiv*-Druck) geschlängelt unterstrichen werden. In Kursiv-Druck können auch andere Worte des Textes gesetzt werden, die der Autor besonders hervorzuheben wünscht.

Das Zerlegen der Arbeit in mehrere Mitteilungen, um sie kürzer erscheinen zu lassen, ist unzulässig.

Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel nicht die gleichen sind.

Danksagungen können in Form von Fußnoten zum Beitragstitel oder als kurzer Petitabschnitt am Schluß der Arbeit gebracht werden. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

In der Korrektur sollen nur Druckfehler verbessert, jedoch keine inhaltlichen oder stilistischen Änderungen vorgenommen werden. 10% der Satzkosten übersteigende Korrekturkosten müssen den Autoren in Rechnung gestellt werden.

Handbuch der Pflanzenphysiologie
Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von W. RUHLAND, Unterdeufstetten
In Gemeinschaft mit E. ASHBY, Belfast · J. BONNER, Pasadena · M. GEIGER-HUBER, Basel · W. O. JAMES, Oxford · A. LANG, Pasadena · D. MÜLLER, Kopenhagen · M. G. STÅLFELT, Stockholm

In 18 Bänden

12. Band

Pflanzenatmung einschließlich Gärungen und Säurestoffwechsel

Plant respiration inclusive fermentations and acid metabolism

Redigiert von JOHANNES WOLF

Mit 352 Abbildungen. CCC, 2542 Seiten Gr.-8°. 1960.
(34 Beiträge in englischer, 1 Beitrag in französischer, 28 Beiträge in deutscher Sprache)

In zwei Teile gebunden, die nur zusammen abgegeben werden
Ganzleinen DM 598,—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes
Subskriptionspreis Ganzleinen DM 478,40;
jedoch ist jeder Band zum Ladenpreis einzeln käuflich

INHALTSÜBERSICHT

Erster Teil:
Einleitung und Übersicht · Der Chemismus der Sauerstoffatmung und der Gärungen.

Zweiter Teil:
Analyse der Atmungsvorgänge · Biologie der Atmung · Der Säurestoffwechsel der Pflanzen · Kreislauf des Kohlenstoffs · Namenverzeichnis — Author Index · Sachverzeichnis (Deutsch—Englisch) · Subject Index (English—German).

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A G., Würzburg
Printed in Germany